

**Untersuchungen zur  
Phosphorylierung von Rhodopsin  
und deren Einfluss  
auf die Arrestin-Rhodopsin-Bindung**

**D I S S E R T A T I O N**

zur Erlangung des akademischen Grades  
d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat)  
im Fach Biophysik

eingereicht an der  
Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Diplom-Biochemikerin Vivien Vogt

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin:  
Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter: 1.) Prof. Dr. Franz Bartl  
2.) Prof. Dr. Peter Hegemann  
3.) Prof. Dr. Ulrike Alexiev

Tag der mündlichen Prüfung am: 23. April 2021

Die vorliegende Dissertation wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Franz Bartl sowie unter der Betreuung von Dr. Martin Heck an der Charité – Universitätsmedizin Berlin im Institut für medizinische Physik und Biophysik (IMBP) durchgeführt und verfasst.

*Für Krümelopa,  
da du immer an mich geglaubt hast...*

## Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Franz Bartl bedanken, dass er mir als Doktorvater die Möglichkeit gab, meine Dissertation anzufertigen. Im gleichen Zuge möchte ich ebenso bei Prof. Dr. Peter Hegemann für die sofortige Übernahme des Zweitgutachtens danken, mit dessen Zusage es mir möglich war, meine Dissertation an der Humboldt-Universität zu Berlin anzumelden.

Mein innigster Dank geht an Dr. Martin Heck, der mir die Chance zur Dissertation gab, mir einen Platz in seiner Forschung, seiner Arbeitsgruppe und seinem Labor gab und mir zu jeder Zeit seine Hilfe und Unterstützung anbot. Als er mir sein Forschungsthema vorstellte, gelang es ihm, mich vom ersten Augenblick an restlos zu begeistern, sodass ich genau wie er all mein Herzblut in das dieser Arbeit zugrundeliegende Thema stecken konnte. In seiner Arbeitsgruppe wurde ich sofort mit offenen Armen empfangen. Daher danke ich meinen Kollegen Brian Bauer und Julius Naujoks ebenfalls vielmals, denn sie ließen mich nie allein, retteten mich aus jeder brenzligen Labor-situation, unterstützten mich bei allem, was ich mir vornahm, lachten mit mir und trösteten mich, wann immer Rückschläge meine Motivation auszubremsen drohten. Brian Bauer gilt zudem mein besonderer Dank, denn ohne seine Expression der Arrestinkonstrukte hätte es diese Arbeit nicht gegeben.

Von ganzem Herzen danke ich Dr. Martha Sommer, die immer ein offenes Ohr für mich hatte, mich motivierte und förderte und die ein großes Vorbild für mich geworden ist. Sie zeigte mir, dass man im Leben für die Wissenschaft brennen kann und dabei trotzdem niemals seine Familie vernachlässigen muss. Ihr Funken konnte mich in manch dunkler Zeit beruhigen.

Ich danke ebenfalls allen Kollegen des Instituts für medizinische Physik und Biophysik, insbesondere Anja Koch, Dr. Ciara Lally, Dr. Michal Szczepek, für die einmalige, großartige Unterstützung sowie die vielen anregenden Diskussionen und das angenehme Betriebsklima, welches ich niemals als selbstverständlich hinnahm.

Natürlich gilt mein Dank auch meinen Eltern, die mir eine große mentale Stütze waren und die nie müde wurden, mir in meiner grenzenlosen Begeisterung für Biochemie und Wissenschaft zuzuhören.

Zu guter Letzt danke ich dem Menschen, ohne den ich niemals durchgehalten hätte. Du hast mich bei jedem Rückschlag aufgefangen, ermutigt und mir gezeigt, dass jedes noch so unüberwindbar scheinende Problem vielmehr eine Herausforderung ist, die ich meistern werde: Danke, André.



## **Zusammenfassung**

Die phosphorylierungsabhängige Bindung von Arrestin an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) ist ein weit verbreiteter Mechanismus, um aktive Rezeptoren zu inhibieren. Für die Bindung von Arrestin an lichtaktiviertes, phosphoryliertes Rhodopsin (pRho), einem GPCR, der sich in der Diskmembran der Stäbchenzellen der Netzhaut befindet, ist in Lipidmembranen die Phosphorylierung von zwei der insgesamt sieben Phosphorylierungsstellen im Rezeptor-C-Terminus nötig, wohingegen drei Phosphate das Arrestin quantitativ aktivieren. Welchen Einfluss höhere Phosphorylierungsniveaus auf die Rezeptor-Arrestin-Interaktion haben, ist bisher ungeklärt. In dieser Arbeit wurde daher eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Rhodopsin-Phosphorylierung etabliert, die unterschiedlich phosphorylierten Rhodopsin-Spezies präparativ getrennt und mit den isolierten phosphorylierten Rhodopsin-Spezies verschiedene Parameter der Rezeptor-Arrestin-Interaktion, wie z.B. die Bindungsstöchiometrie der resultierenden pRho-Arrestin-Komplexe, untersucht. Für die Charakterisierung der Arrestinbindung wurden Titrations mit drei verschiedenen fluoreszenzmarkierten Arrestinmutanten (*site-directed fluorescence titrations*) und phosphoryliertem Rhodopsin in gemischten Phospholipid/Detergens-Mizellen durchgeführt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass der Phosphorylierungsgrad von Rhodopsin neben der Affinität von Arrestin auch die Bindungsstöchiometrie beeinflusst. So haben die Komplexe bei geringem Phosphorylierungsgrad eine 2 : 1 (pRho : Arrestin) Stöchiometrie, während bei einem sehr hohen Phosphorylierungsgrad bevorzugt 1 : 1 pRho-Arrestin-Komplexe gebildet werden. Zudem weisen ein unterschiedliches Elutionsverhalten bei der säulenchromatographischen Trennung und Abweichungen in der pRho-Arrestin-Stöchiometrie verschiedener pRho-Präparationen mit ähnlicher Gesamtanzahl an Phosphaten auf einen zusätzlichen Einfluss unterschiedlicher Phosphorylierungsmuster hin. Insgesamt deuten die Daten auf eine komplexe Beziehung zwischen dem Phosphorylierungsgrad der Rezeptoren und dem Arrestin-Bindungsmodus hin.

## Abstract

The phosphorylation-dependent binding of arrestin to G protein-coupled receptors (GPCRs) is a widely used mechanism to inhibit active receptors. In lipid membranes, the binding of arrestin to light-activated, phosphorylated rhodopsin (pRho), a GPCR located in the disc membranes of retinal rod cells, requires the phosphorylation of two of the seven phosphorylation sites in the receptor C-terminus, whereas three phosphates are required to completely activate arrestin. The influence of higher phosphorylation levels on the receptor/arrestin interaction is still unclear. In this thesis, a method for the quantitative determination of rhodopsin phosphorylation was established, rhodopsin species with varying degrees of phosphorylation were separated preparatively and different parameters of the receptor/arrestin interaction, such as the binding stoichiometry of the resulting pRho/arrestin complexes, were investigated for each isolated phosphorylated rhodopsin species. For the characterization of arrestin binding, titrations with three different fluorescently labeled arrestin mutants (site-directed fluorescence titrations) and phosphorylated rhodopsin in mixed phospholipid/detergent micelles were performed.

The data obtained in this work show that the phosphorylation level of rhodopsin influences the binding stoichiometry in addition to the affinity of arrestin binding to rhodopsin. Thus, complexes with a low level of phosphorylation have a 2 : 1 (pRho : arrestin) stoichiometry, whereas 1 : 1 pRho/arrestin complexes are preferably formed at a very high degree of phosphorylation. In addition, a different elution behaviour during chromatographic separation and variances in the pRho/arrestin stoichiometry of different pRho preparations with similar overall number of phosphates indicate an additional influence of distinct phosphorylation patterns. Overall, the data indicate a complex relationship between receptor phosphorylation level and arrestin binding mode.

## **Liste der Posterpräsentationen**

Teile dieser Arbeit wurden vorgestellt in:

Vogt, V., Naujoks, J., Hofmann K.P. and Heck M. Influence of rhodopsin phosphorylation on rhodopsin/arrestin interaction. *SFB 740 Retreat (2016) September 29 – October 01, Potsdam.*

Vogt, V., Naujoks, J., Sommer, M.E., Hofmann K.P. and Heck M. Influence of rhodopsin phosphorylation on rhodopsin/arrestin interaction. *Early Career Scientist Forum on GPCR Signal Transduction (ECSF-GPCR) (2018) July 11 – 14, Berlin.*

Vogt, V., Naujoks, J., Sommer, M.E., Hofmann K.P. and Heck M. Influence of rhodopsin phosphorylation on rhodopsin/arrestin interaction. *Membranes and Modules – 3<sup>rd</sup> International Symposium of Sonderforschungsbereiche 740 and 958 (2018) September 05 – 08, Berlin.*

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung .....	V
Abstract.....	VI
Liste der Posterpräsentationen.....	VII
I. Abkürzungsverzeichnis .....	XIII
II. Abbildungsverzeichnis.....	XVI
III. Tabellenverzeichnis.....	XVIII
1 Einleitung .....	1
1.1 Rhodopsin als Modell-GPCR .....	2
1.1.1 Was ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor? .....	2
1.1.2 Die Stäbchenzelle .....	2
1.1.3 Rhodopsin.....	6
1.1.4 Die visuelle Signalkaskade.....	9
1.1.5 Termination des Signalweges.....	14
1.1.5.1 Inhibition des aktivierten Rezeptors.....	14
1.1.5.2 Inhibition der Signalkaskade.....	15
1.1.6 Visueller Retinalzyklus .....	16
1.1.7 Phosphorylierung des aktiven Rezeptors.....	17
1.1.8 Rhodopsin als Dimere?.....	21
1.1.9 Lipidzusammensetzung der Diskmembran .....	22
1.2 Arrestin-Rhodopsin-Interaktion.....	23
1.2.1 Arrestin .....	23
1.2.2 Arrestin-Rhodopsin-Bindung .....	26
1.2.3 Stöchiometrie der Arrestin-Rhodopsin-Bindung.....	31
1.3 Zielsetzung der Arbeit .....	33

2	Ergebnisse .....	34
2.1	Gewinnung und Aufreinigung von phosphoryliertem Rhodopsin.....	34
2.1.1	Charakterisierung der Phosphorylierung in Diskmembranen .....	34
2.2	Etablierung einer Methode zur Analyse der Rhodopsinphosphorylierung.....	37
2.2.1	Trennung von phosphoryliertem Rhodopsin via IEF .....	37
2.2.2	Identifizierung der IEF-Banden.....	39
2.3	Separation von pRho-Spezies .....	41
2.4	Fluoreszenzbasierte Untersuchungen zur Rezeptorbindung von Arrestin.....	47
2.4.1	Fluoreszenzbasierte Titrationsen mit Rhodopsin in Diskmembranen .....	47
2.4.2	Fluoreszenzbasierte Titrationsen mit gereinigtem pRho .....	48
2.4.2.1	Einfluss von DOPA.....	49
2.4.2.2	Titrationen mit Asolectin .....	51
2.4.2.3	Titrationen mit einer Phospholipidmischung .....	52
2.4.2.4	Titrationen mit Ölsäure .....	53
2.4.2.5	Titration mit DOPA mit Arr I299B/L173W .....	55
2.4.2.6	Titration mit DOPA mit Arr S344NBD .....	57
2.4.2.7	Vergleich der unterschiedlichen DOPA/DDM-pRho-Spezies- Herstellung für Arrestintitrationsen .....	58
2.4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse für ungetrenntes pRho.....	60
2.4.4	Titrationen mit pRho-Spezies.....	60
2.4.4.1	Titrationen mit Arr I72NBD .....	61
2.4.4.2	Titrationen mit Arr I299B/L173W.....	64
2.4.4.3	Titrationen mit Arr S344NBD.....	67
2.4.5	Arrestintitrationsen nach Rezeptordephosphorylierung.....	71
2.4.5.1	Arr 344NBD-Titration mit dephosphoryliertem Rho.....	71
2.4.6	Zusammenfassung der Titrationsergebnisse mit pRho-Spezies .....	74

2.4.7	Rezeptortitrationen .....	76
3	Diskussion .....	79
3.1	Quantifizierung der Rhodopsinphosphorylierung durch IEF .....	79
3.2	Präparative Trennung der unterschiedlichen pRho-Spezies .....	82
3.3	Einfluss der Phosphorylierung auf die Stöchiometrie .....	84
3.3.1	Verwendete Arrestinmutanten .....	84
3.3.2	Fluoreszenzbasierte Bindungsanalysen .....	85
3.3.3	Fluoreszenzbasierte Bindungsanalysen mit isolierten pRho-Spezies.....	87
3.3.4	Hochphosphorylierte Rho-Spezies .....	92
3.4	Variabilität der Arrestintitrationen.....	94
3.4.1	Unterschiede der Präparationen.....	95
3.4.2	Unterschiede bei der Handhabung der Proben und Durchführung der Experimente.....	96
3.5	Struktur und Bildung der Rhodopsin-Arrestin Komplexe.....	98
3.6	Physiologische Rolle der unterschiedlichen Stöchiometrien.....	103
3.7	Ausblick .....	105
4	Material und Methoden .....	108
4.1	Geräte .....	108
4.2	Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....	109
4.3	Software .....	109
4.4	Präparationen .....	109
4.4.1	Präparation der Außensegmente der Stäbchenzelle.....	110
4.4.2	Präparation der gewaschenen Diskmembranen.....	111
4.4.3	Präparation des phosphorylierten Rhodopsins .....	111
4.4.4	11- <i>cis</i> -Retinal-Herstellung.....	112
4.5	Untersuchungen mittels UV-Vis-Spektrometrie.....	113

4.5.1	UV/Vis-Spektrum von Rhodopsin .....	113
4.5.2	Konzentrationsmessung .....	114
4.6	Molekularbiologische und biochemische Methoden .....	115
4.6.1	Auftrennung von Proteinen via SDS-PAGE .....	115
4.6.2	Aufreinigung mit Concanavalin A .....	115
4.6.3	Isoelektrische Fokussierung .....	117
4.6.4	Gravitations-Western-Blot .....	119
4.6.5	Präparative Trennung der pRho-Spezies .....	120
4.6.6	Extra Meta II-Messung .....	121
4.6.7	Proteolyse mit Asp-N .....	122
4.6.8	Dephosphorylierung mit AP .....	123
4.6.9	Dephosphorylierung mit PP2A .....	123
4.6.10	DOPA-Präparation .....	124
4.6.11	Ölsäure-Präparation .....	125
4.6.12	Asolectin-Präparation .....	125
4.6.13	Lipidemix-Präparation .....	126
4.6.14	Arrestinmutationen .....	127
4.6.15	Expression und Aufreinigung von Arrestin .....	127
4.6.16	Fluoreszenzmarkierung von Arrestin .....	128
4.7	Untersuchungen mittels Fluoreszenzspektroskopie .....	130
4.7.1	Stationäre Fluoreszenzspektroskopie .....	130
4.7.2	Zeitbasierte Fluoreszenzspektroskopie .....	130
4.7.3	Arrestintitrationen .....	131
4.7.4	Rezeptortitrationen .....	131
4.7.5	Mathematische Analyse der Titrationskurven .....	132
5	Literaturverzeichnis .....	134

6	Anhang .....	146
6.1	Pufferliste .....	146
6.2	Extinktionskoeffizienten .....	146
6.3	Ergänzende Abbildungen .....	147
6.3.1	IEF-Bedingungen .....	147
6.3.2	RS-Vergleich mit unterschiedlichem pH-Wert .....	148
6.3.3	Weitere RS-Läufe .....	149
6.3.4	RS-Läufe im Überblick .....	150
6.3.5	Lipidemix-Bedingungen .....	153
6.3.6	Ölsäure-Bedingungen .....	153
6.3.7	Darstellung der stationären Fluoreszenzmessung .....	155
6.3.8	Darstellung der zeitbasierten Fluoreszenzmessung .....	156
6.3.9	Arr I299B/L173W-Titrationsen mit pRho-Spezies aus RS25 .....	157
6.3.10	Arr S344NBD-Titrationsen mit pRho-Spezies aus RS25 .....	158
6.3.11	Weitere Rezeptortitrationsen mit Arr S344NBD .....	159
7	Eidesstattliche Erklärung .....	161



## I. Abkürzungsverzeichnis

Abs	Absorption
AP	Alkalische Phosphatase aus <i>E.coli</i>
Arr	Arrestin-1
Asp-N	Peptidyl-Asp-Metalloendopeptidase aus <i>Pseudomonas fragi</i>
ATP	Adenosintriphosphat
B, Bimane, mBBr	Monobromobimane
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
BTP	1,3-Bis-[tris-(hydroxymethyl)-methylamino]-propan
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	Guanosin 3', 5'-Cyclophosphat
CNGC	Zyklisch-Nukleotid-gesteuerter Ionenkanal
ConA	Concanavalin A
cps	Zähleinheit pro Sekunde ( <i>counts per second</i> )
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
d	Schichtdicke in cm
Da	Dalton
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-Maltosid
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
dk	dunkel
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOPA	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphat
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphocholin
DOPE	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phosphoethanolamin
DOPS	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -Glycero-3-Phospho-L-Serin
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Eluat (bei Aufreinigung) bzw. Schleife (in Proteinstruktur)
$\epsilon$	Absorptionskoeffizient
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
F	Fluoreszenz
$\Delta F$	Fluoreszenzänderung
FPLC	Schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie ( <i>fast protein liquid chromatography</i> )
FTIR-Messung	Fourier-Transform-Infrarot-Messung
GAP	GTPase-aktivierende Proteine
GC	Guanylatzyklase

GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	GTP-bindendes Protein
G <sub>t</sub>	Transducin
G <sub>t</sub> -HAA	hochaffines C-terminales Peptidanalogen der $\alpha$ -Untereinheit von Transducin (G <sub>t</sub> $\alpha_{(340-350)}$ : ILENLKDCGLF)
GTP	Guanosintriphosphat
H	Helix
h $\nu$	Belichtung
HA	Hydroxylamin
HDL	Lipoprotein hoher Dichte
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hochP	hochphosphoryliert
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
IANBD, NBD	N,N'-Dimethyl-N-(iodoacetyl)-N'-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)ethylenediamin
IEF	isoelektrische Fokussierung
IP	isoelektrischer Punkt
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
IS	Innensegment der Stäbchenzelle ( <i>inner segment</i> )
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k <sub>off</sub>	Dissoziationsrate
k <sub>on</sub>	Assoziationsrate
Kryo-EM	Kryoelektronenmikroskopie
LB-Medium	<i>Lysogeny Broth</i> als Nährmedium für Bakterienkultivierung
M2Rpp	phosphorylierter Acetylcholin-M2-Rezeptor
medP, mediumP	mediumphosphoryliert
Meta I	Metarhodopsin I
Meta II	Metarhodopsin II
Meta III	Metarhodopsin III
MMP	Methyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid
MonoP	schwacher Anionenaustauscher
NADPH	Nikotinamidadenin-Dinukleotidphosphat
n.b.	nicht bestimmt
NCKX1	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -K <sup>+</sup> -Austauscher
n.d.	nicht dargestellt
nonP	unphosphoryliert
N-Terminus	Amino-Terminus
NTSR1	Neurotensin-Rezeptors 1

Ops	Opsin
OG	<i>n</i> -Octyl-β-D-Glucopyranosid
P	Phosphatrest
p44	Spleißvariante von Arrestin-1 (Arr <sup>1-370A</sup> )
PC	Phosphatidylcholin
PDB	Protein Data Bank
PDE	Phosphodiesterase
PE	Phosphatidylethanol
PIPES	Piperazine- <i>N,N'</i> -bis(2-ethansulfonsäure)
pMeta II	phosphoryliertes Metarhodopsin II
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
pOps	phosphoryliertes Opsin
PP	SDS-Probenpuffer
PP2A	Proteinphosphatase 2A
pR	phosphorylierter Rezeptor
pRho	phosphoryliertes Rhodopsin
pRho-Spezies	phosphorylierte Rhodopsin-Spezies
PS	Phosphatidylserin
R	Rezeptor
R*	aktiver Rezeptor
Rho	Rhodopsin
RK	Rhodopsinkinase
ROS	Außensegment der Stäbchenzelle ( <i>rod outer segment</i> )
RPE	retinales Pigmentepithelium
RS	Rhodopsin-Spezies-Separation
RSG	Regulator des G-Protein-Signalings
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>t</i> -bHA	<i>n</i> - <i>tert</i> -Butylhydroxylamin
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween® 20
TCA	Trichloressigsäure
UniProtKB	Universal-Protein-Knowledgebase (zentrale Datenbank für Proteinsequenzen)
ÜS	Überstand
V2Rpp	C-terminales Phosphopeptid des Vasopressin-2-Rezeptors
W	Waschfraktion
WMs	gewaschene Diskmembranen ( <i>washed membranes</i> )
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht/Volumen ( <i>weight/volume</i> )
w/w	Gewicht/Gewicht ( <i>weight/weight</i> )

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bleich- und Regenerationsprozess einer Retina.....	1
Abbildung 2: Aufbau der Retina .....	3
Abbildung 3: Schema der Stäbchenzelle .....	5
Abbildung 4: Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin .....	7
Abbildung 5: Lichtinduzierte Isomerisierung.....	10
Abbildung 6: Funktionaler Rhodopsinzyklus.....	11
Abbildung 7: Signaltransduktion in der Stäbchenzelle .....	13
Abbildung 8: Der visuelle Retinalzyklus.....	17
Abbildung 9: Rhodopsin mit potenziellen Phosphorylierungsstellen im C-Terminus. 19	
Abbildung 10: Struktur von basalem Arrestin-1 .....	24
Abbildung 11: Aktivierung und Deaktivierung von Rhodopsin .....	28
Abbildung 12: Arrestin-Interaktionen .....	29
Abbildung 13: Extra Meta II-Messungen mit unterschiedlich phosphorylierten Diskmembranen.....	35
Abbildung 14: Optimierung der C-terminalen Proteolyse von Rhodopsin mit Asp-N.. 36	
Abbildung 15: IEF-Trennung verschieden phosphorylierter Rhodopsin-Präparationen 38	
Abbildung 16: Western-Blot nach IEF .....	39
Abbildung 17: Dephosphorylierung von pRho .....	41
Abbildung 18: Rhodopsin-Spezies-Separation von phosphoryliertem Rhodopsin .....	42
Abbildung 19: RS-Läufe 17 & 19 .....	44
Abbildung 20: Arr I72NBD-Titration mit pRho in Diskmembranen.....	48
Abbildung 21: Einfluss von DOPA auf Arrestin-pRho-Bindung.....	49
Abbildung 22: DOPA-DDM-Einfluss auf pRho-Bindung verschiedener Arr-Mutanten50	
Abbildung 23: Arr I72NBD-Titration mit DOPA/DDM.....	51
Abbildung 24: Arr I72B-Titration mit Asolectin/DDM.....	52
Abbildung 25: Arr-Titration mit Lipidemix/DDM.....	53
Abbildung 26: Arr I72B-Titration mit Ölsäure- bzw. DOPA/DDM.....	54
Abbildung 27: Arr I299B/L173W-Titration mit DOPA/DDM im Vergleich .....	56
Abbildung 28: Arr S344NBD-Titration mit DOPA/DDM.....	57
Abbildung 29: Vergleich von DOPA/DDM-pRho-Spezies-Präparationen.....	59

Abbildung 30: Arr I72NBD-Titration mit pRho-Spezies.....	62
Abbildung 31: Arr I299B/L173W-Titration mit pRho-Spezies .....	65
Abbildung 32: Arr S344NBD-Titration mit pRho-Spezies .....	68
Abbildung 33: Arr S344NBD-Titration mit pRho nach Dephosphorylierung.....	72
Abbildung 34: Arr S344NBD-Titration mit dephosphorylierten 6/7-P-Proben.....	73
Abbildung 35: Rezeptortitration mit Arr S344NBD .....	77
Abbildung 36: Vergleich der Arrestinorientierung im $\beta$ -Arrestin-1-Komplex .....	89
Abbildung 37: Messungen einzelner pRho-Spezies mit Arr S344NBD .....	91
Abbildung 38: Modelle der möglichen Rhodopsin-Arrestin-Komplexe.....	100
Abbildung 39: Bildung von Rhodopsin-Arrestin-Komplexen .....	102
Abbildung 40: UV/Vis-Spektren zur Konzentrationsbestimmung.....	113
Abbildung 41: ConA-Aufreinigung .....	117
Abbildung 42: DOPA-Struktur.....	124
Abbildung 43: Ölsäure-Struktur .....	125
Abbildung 44: Lipidemix-Zusammensetzung .....	126
Abbildung 45: Einfluss von Phospholipiden, Retinal und Proteolyse durch Asp-N in der IEF .....	147
Abbildung 46: RS-Vergleich mit unterschiedlichem pH-Wert .....	148
Abbildung 47: RS-Lauf #20 & #21 .....	149
Abbildung 48: RS-Lauf #23 & #24 .....	149
Abbildung 49: RS-Lauf #25 & #26 .....	150
Abbildung 50: Lipidemix-Titration.....	153
Abbildung 51: Ölsäure-Titrationsen .....	154
Abbildung 52: Stationäre Fluoreszenzmessung .....	155
Abbildung 53: Zeitbasierte Fluoreszenzmessung.....	156
Abbildung 54: Arr I299B/L173W-Titration mit pRho-Spezies aus RS25 .....	157
Abbildung 55: Arr S344NBD-Titration mit pRho-Spezies aus RS25.....	158
Abbildung 56: Weitere Rezeptortitrationsen .....	159

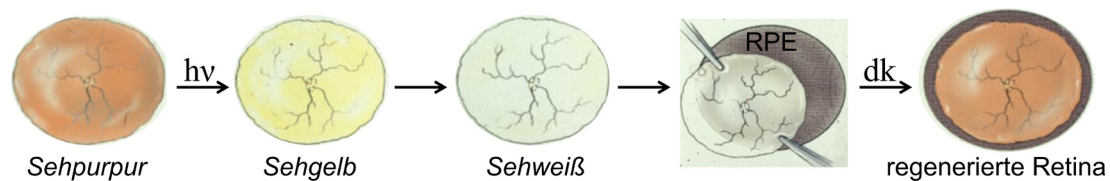
### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Prozentuale Verteilung der Phosphatreste innerhalb der pRho-Spezies <sup>a</sup> .....	45
Tabelle 2: Titrationsergebnisse der ungetrennten pRho-Proben .....	60
Tabelle 3: Titrationsergebnisse mit pRho-Spezies .....	74
Tabelle 4: Maximal mögliche prozentuale DDM-Endkonzentration der pRho-Spezies in den Fluoreszenzmessungen der Arrestintitrationen.....	76
Tabelle 5: IP-Zuordnungen der pRho-Spezies .....	80
Tabelle 6: Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Arrestinmutanten und deren Verhalten nach pRho-Bindung in Fluoreszenzexperimenten.....	84
Tabelle 7: Vergleich von hochP und mediumP der ungetrennten pRho-Proben.....	86
Tabelle 8: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte .....	108
Tabelle 9: IEF-Laufbedingungen.....	119
Tabelle 10: Liste der in dieser Arbeit eingesetzten Pufferlösungen.....	146
Tabelle 11: Liste der verwendeten Extinktionskoeffizienten .....	146
Tabelle 12: RS-Lauf #17 & #19 .....	151
Tabelle 13: RS-Lauf #20 & #21 .....	151
Tabelle 14: RS-Lauf #23 & #24 .....	152
Tabelle 15: RS-Lauf #25 & #26 .....	152

# 1 Einleitung

Das menschliche Auge kann sich problemlos an die verschiedenen Lichtverhältnisse seiner Umgebung anpassen. Es ist in der Lage, sogar noch im schwachen Dämmerlicht zu sehen. Hierfür ist das Photopigment Rhodopsin der Netzhaut verantwortlich. Sucht man in der Datenbank PubMed nach dem Stichwort „Rhodopsin“, so erhält man über 11.500 Publikationen der letzten 83 Jahre<sup>1)</sup>. Diese Fülle an wissenschaftlichen Veröffentlichungen zeigt, wie intensiv das Thema in den letzten Jahrzehnten untersucht wurde und dass es auch weiterhin Gegenstand aktueller Forschung ist.

Bereits 1876 begannen die Arbeiten zur retinalen Photochemie mit der Veröffentlichung einer Abhandlung von Franz Boll, der entdeckt hatte, dass die Retina von Fröschen rötlich erscheint, wenn sie im Dunkeln gehalten ist, im Licht jedoch nach kurzer Zeit gebleicht wird. 1877 bezeichnete Friedrich Wilhelm Kühne die rötliche retinale Farbe als *Sehpurpur* und zeigte, dass sich diese nach Belichtung erst gelblich (*Sehgelb*) verfärbt, bis sie dann vollständig gebleicht (*Sehweiß*) vorliegt (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Bleich- und Regenerationsprozess einer Retina**

Böll und Kühne beobachteten, dass die isolierte Retina eines Frosches im Dunkeln rötlich gefärbt vorliegt (*Sehpurpur*). Nach Belichtung ( $h\nu$ ) wird die Retina über einen gelb gefärbten Zwischenschritt (*Sehgelb*) vollkommen farblos gebleicht (*Sehweiß*), ist jedoch vollständig regenerierbar, wenn man sie unter Lichtausschluss ( $dk$ ) auf eine Schicht des retinalen Pigmentepitheliums (RPE) legt (modifiziert nach Ripps, 2008).

Kühne zeigte auch als Erster, dass das *Sehpurpur* im Dunkeln nach dem Bleichen wieder regeneriert werden kann, und prägte den wissenschaftlichen Namen Rhodopsin für das rötliche Sehpigment (Kühne, 1877, Kühne, 1878, zusammengefasst in Marmor & Martin, 1978).

<sup>1)</sup> <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, Stand: 23.10.2020, 17:54 Uhr (Die Publikationsauflistung über Rhodopsin beginnt bei PubMed im Jahr 1937).

## **1.1 Rhodopsin als Modell-GPCR**

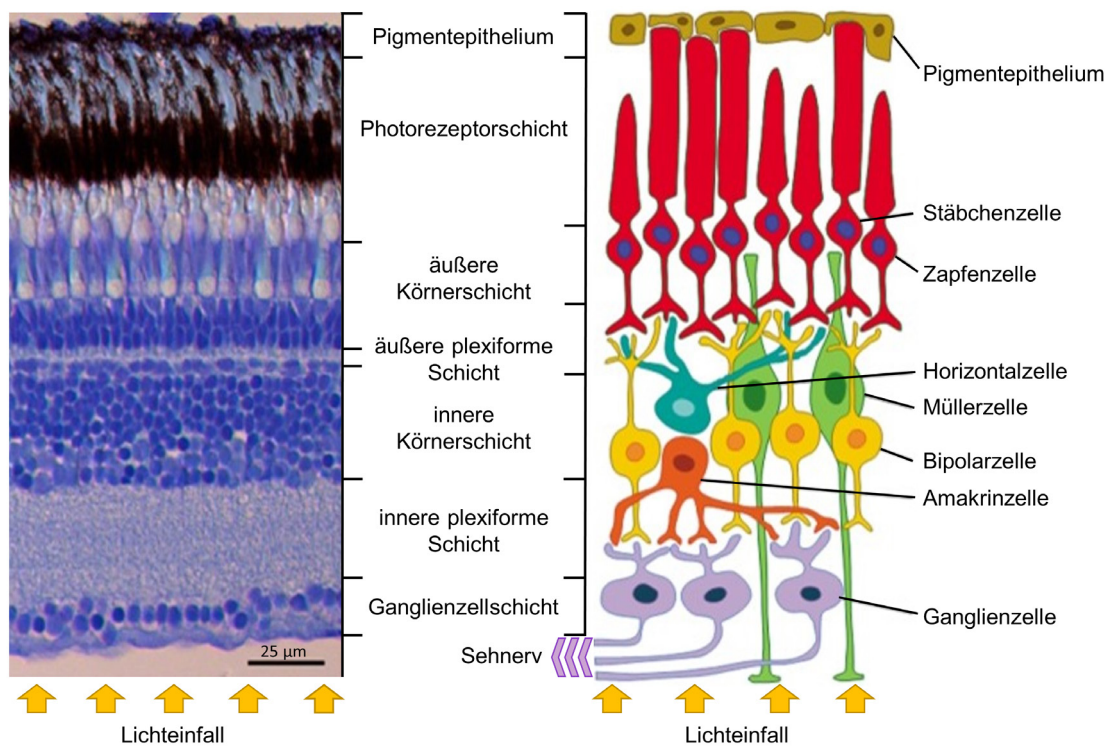
### **1.1.1 Was ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor?**

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sind Rezeptorproteine, die nach Aktivierung über heterotrimere GTP-bindende Proteine (G-Proteine) sowie nach Phosphorylierung und Arrestinbindung diverse intrazelluläre Signalkaskaden auslösen können. GPCRs können aufgrund ihrer Sequenz und Funktion in sechs Klassen (A bis F) unterteilt werden. Bei den drei Hauptklassen handelt es sich um Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren (Klasse A), Sekretinrezeptoren (Klasse B) und metabotrope Neurotransmitterrezeptoren (Klasse C). Die größte Klasse bildet Klasse A mit etwa 80 % aller GPCRs (zusammengefasst in Hu et al., 2017). Alternativ können GPCRs auch phylogenetisch als sogenannte „GRAFS“ eingeteilt werden. Dieses System beinhaltet die fünf Hauptfamilien Glutamat (G), Rhodopsin (R), Adhäsion (A), Frizzled/Taste2 (F) und Sekretin (S) (Schiöth & Fredriksson, 2005). Strukturell charakteristisch verfügen GPCRs stets über sieben Transmembrandomänen, die die Zellmembran helikal durchspannen. Als direkte Antwort auf extrazelluläre Hormone, Neurotransmitter, Ionen, Photonen, Duftstoffe oder andere Stimuli ändert sich die Konformation dieser Transmembranhelices, was zur Aktivierung der Rezeptoren führt. Somit spielen GPCRs eine entscheidende Rolle im Organismus und stellen ein attraktives Ziel für Medikamente dar (zusammengefasst in Hilger et al., 2018). 2017 waren bereits 134 verschiedene GPCRs als Arzneimittelziele in der Europäischen Union oder den USA gelistet, was rund 16 % aller bisher identifizierten rund 800 GPCRs entspricht (Sriram & Insel, 2018).

### **1.1.2 Die Stäbchenzelle**

In der etwa 0,4 mm dicken Netzhaut (Retina, siehe Abbildung 2) des menschlichen Auges gibt es zwei verschiedene Arten von Lichtsinneszellen: die Stäbchen- und die Zapfenzellen. Mehr als 100 Millionen Stäbchen- und sechs Millionen Zapfenzellen sorgen so für die Sehkraft des menschlichen Auges. Letztere konzentrieren sich in der Fovea centralis (Sehgrube), während die Stäbchenzellen mit Ausnahme der Fovea verteilt über die ge-





**Abbildung 2: Aufbau der Retina**

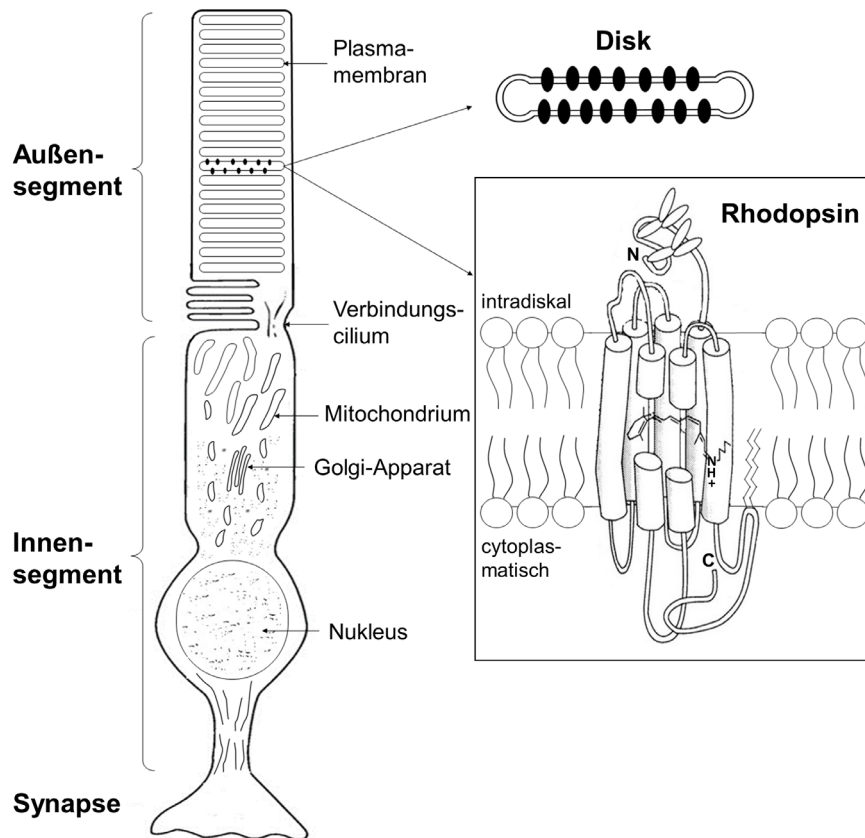
Querschnitt einer Retina eines Zebrafisches (links) verglichen mit der schematischen Darstellung der Retina (rechts). Die Zellen des Pigmentepitheliums umfassen die Photorezeptoren apikal. Bevor das Licht auf die Photorezeptorschicht mit den Zapfen- und Stäbchenzellen (dunkelrot) trifft, müssen alle anderen Schichten überwunden werden (namentlich mittig erwähnt). Die Müllerzellen (grün) leiten als Gliazellen das einfallende Licht an den streuenden Strukturen vorbei zu den dahinterliegenden Photorezeptoren. Die Photorezeptoren leiten das Lichtsignal direkt über die Bipolarzellen (gelb) oder indirekt über horizontale Verbindungen aus Amakrin (hellrot)- und Horizontalzellen (türkis) an die Ganglienzellen (violett) weiter. Letztere bilden Aktionspotenziale aus, welche über ihre Axone im Sehnerv zum Sehzentrum in der Großhirnrinde gelangen (modifiziert nach Gramage et al., 2014).

samte Netzhaut vorliegen (zusammengefasst in Molday & Moritz, 2015). Interessanterweise untersuchte Max Schultze bereits vor über 150 Jahren die Retinae verschiedener Säugetiere und verglich sie mit denen der Vögel, Reptilien und Amphibien. Er beobachtete, dass die Verteilung der Stäbchen und Zapfen bei den größeren Säugetieren (z.B. Rind, Pferd & Schaf) dem Menschen sehr ähnelt, wohingegen die Anzahl an Stäbchenzellen der Zapfen in der Netzhaut nachtaktiver Säugetiere (z.B. Fledermaus, Igel &

Maulwurf) überwog. Er schlussfolgerte schon damals, dass die erhöhte Anzahl an Stäbchenzellen bei nachtaktiven Säugern damit zusammenhängen müsste, dass sich diese Tiere vorwiegend in der Dämmerung oder der Nacht bewegten. Diese physiologische Verschiedenheit brachte er in Zusammenhang mit der Funktion dieser Zellarten. So stellte er die Hypothese auf, dass Stäbchenzellen für das Dämmerungssehen verantwortlich sein mussten, während Zapfenzellen für das Tag- und Farbsehen zuständig seien (Schultze, 1866 & 1867).

Eine Stäbchenzelle setzt sich aus einem Außensegment (*rod outer segment*, ROS) und einem Innensegment (*inner segment*, IS) zusammen (siehe Abbildung 3), welche über ein dünnes Cilium miteinander verbunden sind, das den Proteintransport und -austausch zwischen beiden Kompartimenten gewährleistet. Das Innensegment beinhaltet alle wichtigen Zellorganellen für den Metabolismus der Stäbchenzelle. Es umfasst u.a. den Zellkern, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, den Golgi-Komplex, die Lysosomen und andere subzelluläre Organellen. Unterhalb des Innensegments schließt sich der synaptische Bereich der Stäbchenzelle an. Die Synapse überträgt das Lichtsignal auf bipolare Zellen bzw. andere Sekundärneuronen (Horizontal- und Amakrinzellen), die das Lichtsignal vertikal über Ganglienzellen des Sehnervs weiterleiten, um so das Dämmerungssehen zu ermöglichen (zusammengefasst in Molday & Moritz, 2015).

Das Außensegment der Stäbchenzelle beinhaltet alle Komponenten zur Lichtsignaltransduktion und setzt sich aus 800 bis 1000 münzartig übereinander gestapelten, flachen Vesikeln („Disks“) zusammen, die von einer Plasmamembran umgeben sind (siehe dazu Abbildung 3). Länge und Durchmesser dieser Disks sind bei den Wirbeltieren unterschiedlich ausgeprägt. Die Außensegmente von Säugetieren sind zwischen 20  $\mu\text{m}$  bis 30  $\mu\text{m}$  lang und haben einen Durchmesser von 1,2  $\mu\text{m}$  bis 2,0  $\mu\text{m}$  (Nickell et al., 2007; Gilliam et al., 2012). Der Photorezeptor Rhodopsin bildet als integrales Membranprotein mit mehr als 85 % den Hauptproteinanteil der Disks. Die Disks erhöhen die Gesamtmembranoberfläche um etwa das Tausendfache verglichen mit der Plasmamembranoberfläche der Stäbchenzelle (Mayhew & Astle, 1997) und gewährleisten so, dass ausreichend Platz für die hohe Anzahl an Photorezeptoren zur Verfügung steht. So beinhaltet ein einziges Außensegment etwa 100 Millionen Rhodopsinmoleküle, was einer Proteinkonzentration von etwa 3 mM entspricht.



**Abbildung 3: Schema der Stäbchenzelle**

Die Stäbchenzelle (links) setzt sich aus einem Außensegment und einem Innensegment zusammen. Das Außensegment beinhaltet die dicht gepackten Disks (schematisch rechts oben), die zu 50 % aus dem Photorezeptor Rhodopsin (rechts) bestehen, der die gesamte Diskmembran durchspannt (modifiziert nach Hargrave et al., 1993).

Direkt über den Außensegmenten schließt das retinale Pigmentepithelium (RPE) apikal an. Obwohl Boll und Kühne Ende des 19. Jahrhunderts noch nicht wussten, welche Rolle das RPE für den Photorezeptor spielt, konnte Kühne schon zeigen, dass ein Auflegen einer gebleichten Retina auf das RPE zur Regeneration der roten Farbe führt (Kühne, 1878). Somit war schon früh ersichtlich, dass Bleichen und Regeneration von Rhodopsin als eine Art zyklischer Prozess stattfindet. Heute weiß man, dass das RPE viele wichtige Aufgaben für die Photorezeptoren übernimmt. Es reguliert als äußere Blut-Netzhaut-Schranke den kompletten Stoffaustausch zwischen Photorezeptoren und Blut, übernimmt den Retinalstoffwechsel (siehe Abschnitt 1.1.6 ab Seite 16) und die Phagozytose abge-

storbener Photorezeptoren, was gleichzeitig mit dem Wiederverwerten des Retinals verbunden ist. Ebenso hat es die Aufgabe, Licht, welches der Retina schaden könnte, über die Melaninpigmente zu absorbieren (zusammengefasst in Strauss, 2005).

Die Empfindlichkeit der Stäbchenzellen ist sehr hoch. So führen bereits fünf Lichtphotonen auf der Netzhaut zur Wahrnehmung eines Lichtsignals. Zapfenzellen sind dagegen etwa 25- bis 100-mal weniger sensitiv als Stäbchenzellen (zusammengefasst in Ingram et al., 2016). Bei hohen Lichtverhältnissen sättigen die Zapfenzellen nicht, werden schneller deaktiviert und regenerieren ebenfalls rascher. Die Existenz von mehreren Zäpfchentypen mit verschiedenen spektralen Empfindlichkeiten bildet letztendlich die Basis des Farbsehens (zusammengefasst in Rodieck, 1998).

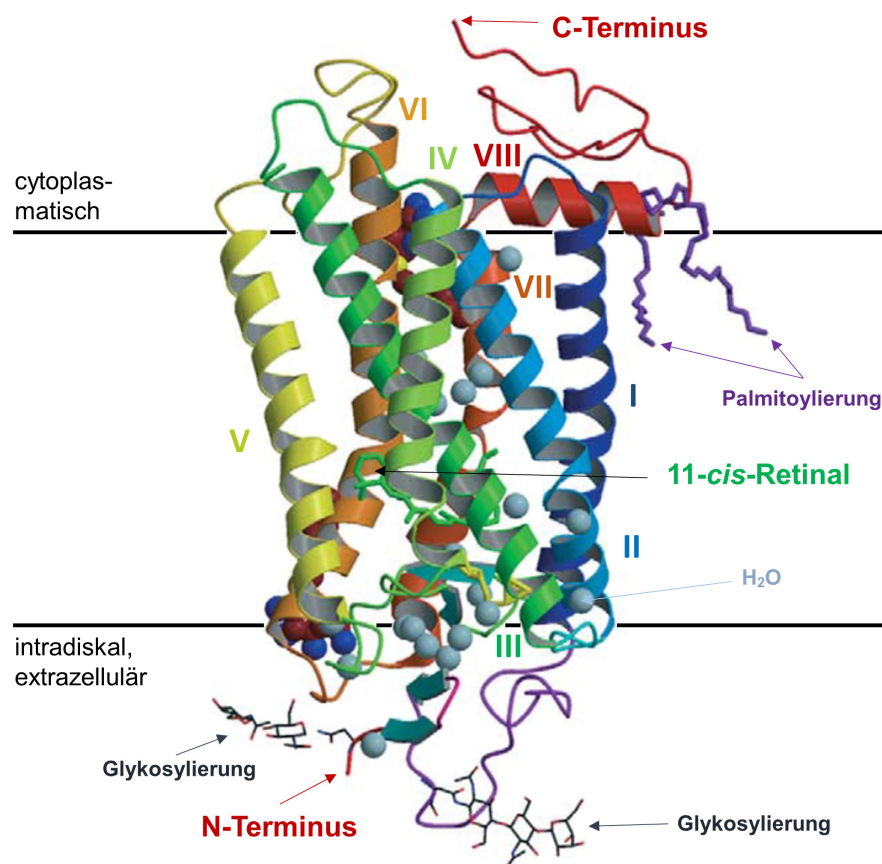
### **1.1.3 Rhodopsin**

Der Photorezeptor Rhodopsin ist als Sehpigment in den Stäbchenzellen der Retina für das Dämmerungssehen verantwortlich und gilt als Paradebeispiel der Klasse A GPCRs, zu denen etwa 80 % aller GPCRs gehören. Rhodopsin besteht aus dem Apoprotein Opsin, an dessen Lysin<sup>296</sup> im inaktiven Dunkelzustand der Chromophor 11-*cis*-Retinal über eine Schiff'sche Base gebunden ist. Im Dunkelzustand hat Rhodopsin ein Absorptionsmaximum bei 498 nm (Matthews et al., 1963).

Bovines Rhodopsin (UniProtKB-Eintrag: P02699), welches in dieser Arbeit untersucht wurde, ist ein integrales Membranprotein mit zwei Oligosaccharidresten, die am N-Terminus (Asn<sup>2</sup> und Asn<sup>15</sup>) N-glykosidisch gebunden sind (Fukada et al., 1982). Das Apoprotein Opsin hat 348 Aminosäuren (etwa 40 kDa) und ist dem humanen Rhodopsin bis auf 23 Aminosäuren identisch. Die erste 3D-Röntgenkristallstruktur von Rhodopsin wurde im Jahr 2000 von Palczewski und Kollegen gelöst (Palczewski et al., 2000). Die Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin von Okada und Kollegen aus dem Jahr 2004 ist in Abbildung 4 dargestellt.

Rhodopsin hat wie alle GPCRs sieben Transmembrandomänen, die die Zellmembran helikal durchspannen und als Helix-I bis VII bezeichnet werden. Die extrazelluläre (= intradiskale) sowie die intrazelluläre Region des Rhodopsins werden jeweils aus drei interhelikalen Schleifen gebildet. Etwa die Hälfte der Proteinmasse befindet sich innerhalb der Lipiddoppelschicht. Die andere Hälfte erstreckt sich in etwa gleichen Teilen in den

cytoplasmatischen und intradiskalen Raum. Der N-Terminus des Proteins befindet sich im intradiskalen Bereich, während der C-Terminus im cytoplasmatischen Bereich sitzt. Eine zusätzliche vierte cytoplasmatische Schleife wird durch eine Verankerung des C-Terminus an der Membran über zwei palmitoylierte Cysteinreste (Cys<sup>322</sup> & Cys<sup>323</sup>) gebildet (Ovchinnikow et al., 1988). Sie beinhaltet außerdem die kurze Helix-VIII, welche parallel zur Membranoberfläche verläuft. Zwei Cysteinreste (Cys<sup>110</sup> & Cys<sup>187</sup>) von H-III und E-III (E für die Schleife, die H-IV und H-V verbindet) liegen über eine Disulfidbrücke verbunden vor (Karnik et al., 1988).



**Abbildung 4: Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin**

Kristallstruktur von bovinem Rhodopsin (2,2 Å Auflösung) nach Okada et al., 2004. Helices I bis VIII sind wie folgt gefärbt: dunkelblau: H-I; blau: H-II; grün: H-III; hellgrün: H-IV; gelb: H-V; orange: H-VI; dunkelorange: H-VII; rot: H-VIII. Das gebundene 11-*cis*-Retinal ist grün dargestellt. Wassermoleküle sind als hellblaue Kugeln markiert. Im Hintergrund der Kristallstruktur deuten zwei Heptylthioglukosidmoleküle (dunkelrote/dunkelblaue Kugeln) den Transmembranbereich an (modifiziert nach Okada et al., 2004. PDB-Eintrag: 1U19).

Helix-I (dunkelblau in Abbildung 4, Pro<sup>34</sup> bis Gln<sup>64</sup>) bildet mehrere Wasserstoffbrückenbindungen mit den H-II, H-VII und H-VIII aus.

Helix-II (blau in Abbildung 4, Pro<sup>71</sup> bis His<sup>100</sup>) ist bei Gly<sup>89</sup> und Gly<sup>90</sup> um etwa 30° gekrümmt, was Gly<sup>90</sup> in unmittelbare Nähe von Glu<sup>113</sup>, dem Gegenion der protonierten Schiff'schen Base des Chromophors, bringt. H-II bildet mehrere Wasserstoffbrücken zu H-I, H-III und H-IV aus (Filipek et al., 2003).

Mit 48 Å als längste Helix ist H-III (grün in Abbildung 4, Gly<sup>106</sup> bis Val<sup>139</sup>) besonders wichtig für Rhodopsin. Sie weist zwei Krümmungen bei Gly<sup>120</sup> bis Gly<sup>121</sup> und bei Ser<sup>127</sup> auf. Die große Neigung führt dazu, dass sie in Kontakt zu fünf anderen Helices kommt (II, IV, V, VI und VII). Das Cys<sup>110</sup> am extrazellulären Ende von H-III bildet mit dem Cys<sup>187</sup> des  $\beta$ -Faltblatts eine Disulfidbrücke aus, die hochkonserviert unter den GPCRs ist. Die Mitte von H-III wird aus Glu<sup>113</sup> bis Gly<sup>122</sup> gebildet, welche unterhalb des  $\beta$ -Ionenrings des C<sub>15</sub> des Chromophors verläuft und somit Glu<sup>113</sup> als Gegenion der protonierten Schiff'schen Base zwischen Retinal und Lys<sup>296</sup> bringt. Das C-terminale Ende von H-III bei der cytoplasmatischen Oberfläche beinhaltet das hochkonservierte E(D)RY-Motiv, welches in einer sehr hydrophoben Umgebung zwischen Resten von H-II, H-IV, H-V und H-VI gebildet wird. Während es sich für den Hauptteil der GPCRs um ein DRY-Motiv handelt, ist es beim Rhodopsin ein ERY-Motiv. Hierbei werden zwischen Glu<sup>134</sup>, Glu<sup>247</sup> und Arg<sup>135</sup> Salzbrücken gebildet. Diese ionischen Interaktionen innerhalb der hydrophoben Tasche könnten das Rhodopsin in seiner inaktiven Konformation halten (Filipek et al., 2003).

Helix-IV (hellgrün in Abbildung 4, Glu<sup>150</sup> bis Leu<sup>172</sup>) ist mit 33 Å die kürzeste der acht Helices. Sie verläuft fast senkrecht zur Membranebene. Cys<sup>167</sup> partizipiert in der Ausbildung der Bindungstasche des Chromophors. Über Wasserstoffbrücken und ionische Interaktionen ist H-IV an H-II gekoppelt und interagiert mit H-III (Filipek et al., 2003).

Helix-V (gelb in Abbildung 4, Asn<sup>200</sup> bis Gln<sup>225</sup>) bildet ionische Interaktionen und Wasserstoffbrücken mit H-III, H-IV und H-VI aus. Met<sup>207</sup>, His<sup>211</sup> sowie Phe<sup>212</sup> bilden die Bindungsstelle des  $\beta$ -Ionenrings des Chromophors. Die anschließende Polypeptidkettenverbindung zu H-VI ist kritisch für die Bindung von Transducin, Arrestin und der Rhodopsinkinase (Filipek et al., 2003).

Helix-VI (hellorange in Abbildung 4, Gln<sup>244</sup> bis Phe<sup>276</sup>) interagiert über ionische Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken mit H-III und H-VII. Arg<sup>135</sup> ist mit weiteren Resten aus H-VI verbunden und bildet eine Salzbrücke zum benachbarten Glu<sup>134</sup>. Diese Interaktionen könnten Rhodopsin in seiner basalen, inaktiven Konformation halten. Die hydrophoben Reste Val<sup>250</sup> und Met<sup>253</sup> bilden eine hydrophobe Tasche für die ionische Interaktion innerhalb des ERY-Motivs. Am extrazellulären Ende bilden Lys<sup>245</sup>, Lys<sup>248</sup> und Arg<sup>252</sup> ein positiv geladenes Bündel (*cluster*), wohingegen Try<sup>268</sup>, Phe<sup>261</sup>, Trp<sup>265</sup> und Ala<sup>269</sup> den  $\beta$ -Ionenring umgeben (Filipek et al., 2003).

Helix-VII (dunkelorange in Abbildung 4, Ile<sup>286</sup> bis Met<sup>309</sup>) beinhaltet das wichtige Lys<sup>296</sup>, welches innerhalb der Transmembranregion die kovalente Bindung zum Retinal ausbildet. Sie interagiert mit H-I, H-III sowie H-VI und stabilisiert H-VIII. Am C-terminalen Ende von H-VII liegt das in GPCRs hochkonservierte NPXXY-Motiv. Ein zusätzlicher Knick bei Val<sup>300</sup> liefert dem wichtigen Lys<sup>296</sup> genügend Freiheit für die Änderungen der Retinalstruktur innerhalb der ersten Konformationsänderungen nach Lichtanregung (Filipek et al., 2003).

Die ausschließlich cytoplasmatische Helix-VIII (rot in Abbildung 4, Lys<sup>311</sup> bis Cys<sup>323</sup>) verläuft fast parallel zur Membranebene. Sie interagiert mit H-I und H-VII und weist C-terminal zwei Cysteinreste (Cys<sup>322</sup> und Cys<sup>323</sup>) auf, die über Palmitoylierung in der Membran verankert sind (Filipek et al., 2003). Ebenso beinhaltet aus ROS isoliertes Rhodopsin eine variable Menge an fest an die hydrophobe Transmembranregion gebundenen Phospholipide, welche das Protein möglicherweise stabilisieren (Filipek et al., 2003).

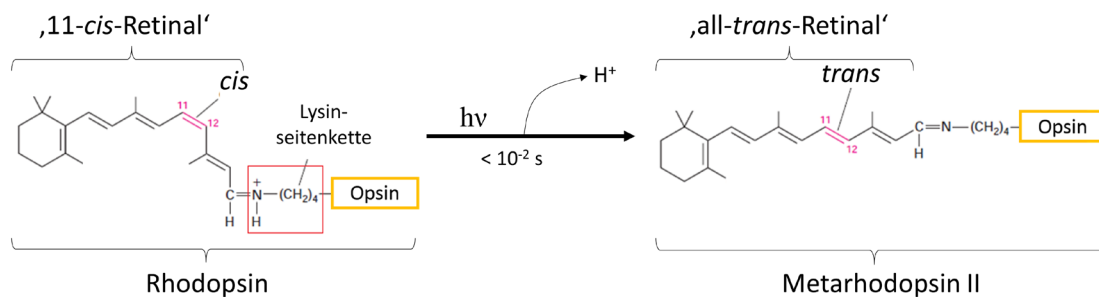
#### 1.1.4 Die visuelle Signalkaskade

Mit seinem konjugierten  $\pi$ -Elektronensystem eignet sich das Retinal sehr für eine effiziente Photonenabsorption. Durch Interaktion mit dem Apoprotein Opsin verschiebt sich die Absorption aus dem nahen UV-Bereich in den grünen Bereich des UV/Vis-Spektrums. Die kovalente Retinylidenverbindung zwischen Chromophor und Opsin wird über die Ausbildung einer Schiff'schen Base mit der  $\epsilon$ -Aminosgruppe des Lysins<sup>296</sup> gewährleistet (Bownds et al., 1967). Im Dunkelzustand ist die Schiff'sche Base protoniert (siehe Abbildung 5), was zu einer erhöhten  $\pi$ -Elektronendichte und einer bathochromen Rotverschiebung des Absorptionsmaximums von 380 nm zu 440 nm führt. Zusammen mit der

sogenannten Opsinverschiebung durch die Interaktionen in der Chromophorbindetasche führt dies bei bovinem Rhodopsin zu einem Absorptionsmaximum bei 498 nm (zusammengefasst in Heck & Hofmann, 2004).

Die Protonierung der Schiff'schen Base wird innerhalb des Proteins über die negativ geladene Carboxylgruppe des Glu<sup>113</sup> stabilisiert. Diese Interaktion ist Teil eines Wasserstoffbrücken-Netzwerkes. Die dominante Interaktion hierbei bildet die Salzbrücke zwischen dem Carboxylation und der protonierten Schiff'schen Base (zusammengefasst in Hofmann et al., 2009). Diverse Interaktionen innerhalb des Proteins führen dazu, dass das Retinal fest im Helixbündel und dass diese Helices wiederum in ihren Positionen fixiert sind. So bildet das ERY-Motiv (Glu<sup>134</sup>-Arg<sup>135</sup>-Tyr<sup>136</sup>) sieben Wasserstoffbrückenbindungen mit umliegenden Aminosäureresten aus (zusammengefasst in Filipek et al., 2003). Met<sup>257</sup> in Helix VI liegt umgeben von einem Leucinbündel vor, welches aus Leu<sup>76</sup> & Leu<sup>79</sup> aus H-II sowie Leu<sup>128</sup> & Leu<sup>131</sup> aus H-III gebildet wird (zusammengefasst in Heck & Hofmann, 2004).

Die Absorption eines Photons bewirkt, dass die 11-*cis*-Konfiguration des Retinals, welche Opsin als inverser Agonist in seinem inaktiven Zustand hält, innerhalb von 200 fs in die all-*trans*-Form übergeht (Wang et al., 1994) (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Lichtinduzierte Isomerisierung**

Inaktives Rhodopsin isomerisiert lichtinduziert ( $h\nu$ ) zum aktiven Metarhodopsin II. Hierbei geht die *cis*-Konfiguration des Retinals in die all-*trans*-Konformation über und die Schiff'sche Base wird deprotoniert.

Diese *cis/trans*-Photoisomerisierung löst über Konformationsänderungen des Rezeptors die Bildung einer Reihe von instabilen Photointermediaten (Photo  $\rightarrow$  Batho  $\rightarrow$  BSI  $\rightarrow$  Lumi) aus, die nur minimale strukturelle Veränderungen aufweisen und aufgrund ihrer



unterschiedlichen Absorptionsmaxima spektrometrisch verfolgt werden können (siehe Abbildung 6).

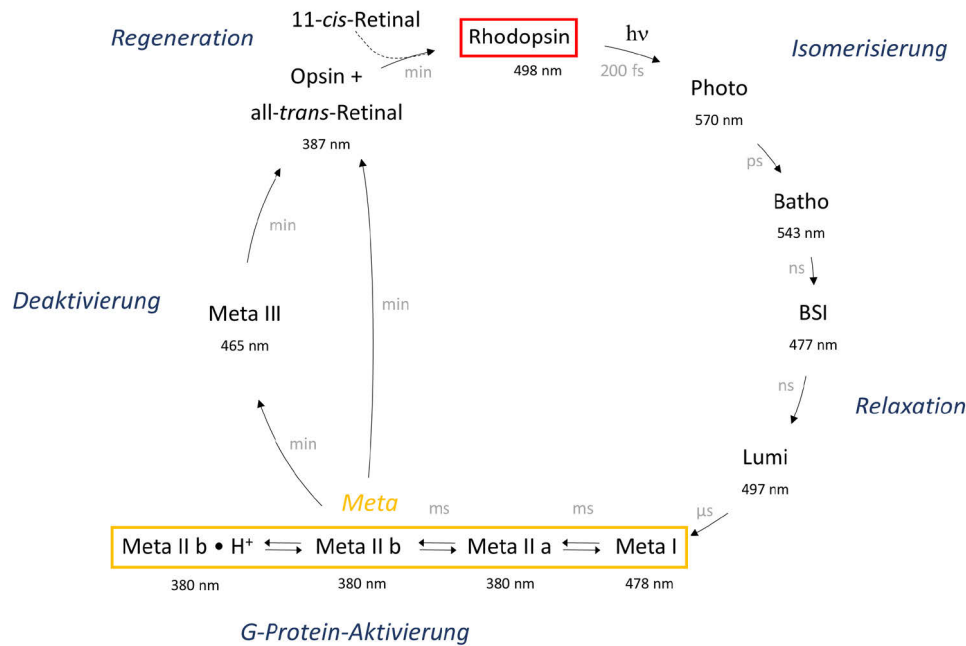


Abbildung 6: Funktionaler Rhodopsinzyklus

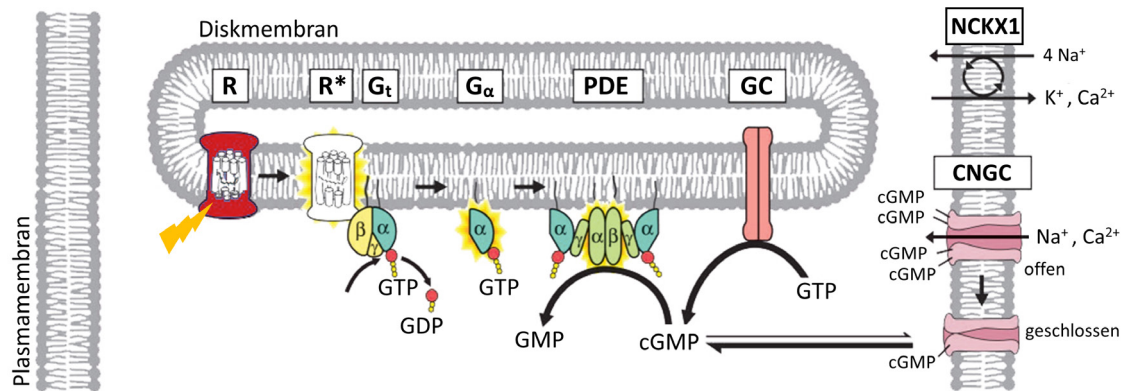
Die Absorption eines Photons ( $h\nu$ ) führt zur Photoisomerisierung des 11-*cis*-Retinals. Innerhalb von nur 200 fs wird Rhodopsin zum Photoprodukt Photorhodopsin (Photo). Das photolysierte Pigment relaxiert thermisch nacheinander zum Bathorhodopsin (Batho), dem „blue shifted intermediate“ (BSI) und dem Lumirhodopsin (Lumi), bis sich ein Gleichgewicht der Metarhodopsinzustände (Meta I – Meta IIa – Meta IIb) einstellt. Diese Änderung kann über eine Verschiebung der Absorptionsmaxima spektrometrisch verfolgt werden. Innerhalb des Meta I-Zustandes ist die Schiff'sche Base protoniert, wohingegen eine Konvertierung von Meta I zu Meta IIa mit Deprotonierung der Schiff'schen Base einhergeht (Blauverschiebung des Absorptionsmaximums). Der Übergang von Meta IIa zu Meta IIb ist von einer Auswärtsbewegung der Helix VI begleitet; der Übergang von Meta IIb zu Meta IIb•H<sup>+</sup> erfolgt durch Protonenaufnahme aus dem Cytosol an Glu<sup>134</sup> im ERY-Motiv. Meta IIb und Meta IIb•H<sup>+</sup> repräsentieren den aktiven Status des Rhodopsinrezeptors, der mit G<sub>i</sub> interagieren kann. Aus dem Meta II-Gleichgewicht zerfällt der Rezeptor entweder direkt oder über einen Zustand mit reprotonierter Schiff'schen Base (Meta III) in Opsin und all-*trans*-Retinal. Anschließend wird Rhodopsin durch Aufnahme von frischem 11-*cis*-Retinal in Opsin regeneriert. Die Zeitangaben beziehen sich auf die physiologische Temperatur 37 °C (modifiziert nach Heck & Hofmann, 2004).

Nach einigen Millisekunden bildet sich ein Gleichgewicht aus den verschiedenen Meta-Zuständen des Rezeptors (Metarhodopsin I  $\rightleftharpoons$  Metarhodopsin II) (Übersicht in Hofmann et al., 2009). Meta I ist das erste Intermediat, bei dem größere Änderungen in der Tertiärstruktur des Proteins auftauchen. Im Meta I-Zustand liegt der Rezeptor noch inaktiv vor, wohingegen er nach Deprotonierung der Schiff'schen Base und Protonierung des Gegenions Glu<sup>113</sup> in den aktiven Meta II-Zustand übergeht, was gleichzeitig das Absorptionsmaximum von 480 nm auf 380 nm verschiebt.

Bei niedrigem pH-Wert oder hoher Temperatur verschiebt sich das Gleichgewicht auf die Meta II-Seite, wohingegen Meta I bei hohem pH-Wert und niedriger Temperatur stabilisiert wird. Die Meta II-Subzustände, welche sich aufgrund ihrer identischen Absorptionsmaxima UV/Vis-spektrometrisch nicht unterscheiden lassen, entstehen nacheinander durch eine Auswärtsbewegung von Helix-VI (Meta IIb) und der Aufnahme eines Protons innerhalb des ERY-Motivs in Helix-III (Meta IIb•H<sup>+</sup>). Unter physiologischen Bedingungen (pH-Wert & Temperatur) akkumuliert Meta IIb•H<sup>+</sup> (Mahalingam et al., 2008).

Meta IIb und Meta IIb•H<sup>+</sup> sind in der Lage, über ihre cytoplasmatische Domäne mit dem heterotrimeren G-Protein (Transducin, G<sub>t</sub>) bestehend aus  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit zu interagieren und so den Austausch des an der  $\alpha$ -Untereinheit des Transducins gebundenen GDP durch GTP zu katalysieren (siehe Abbildung 7). Hierbei formt es einen 1 : 1 Komplex mit Transducin (Ernst et al., 2007). Die  $\gamma$ -Untereinheit ist über einen Farnesylrest und die  $\alpha$ -Untereinheit über einen Myristoylrest in der Diskmembran verankert (Fukada et al., 1990; Kokame et al., 1992; Neubert et al., 1992). Im inaktiven Zustand hat die  $\alpha$ -Untereinheit GDP gebunden. Der C-Terminus der G $\alpha$ -Untereinheit interagiert mit dem aktivierten Rezeptor, was zu Konformationsänderungen innerhalb dieses C-Terminus' und den Regionen um die Nukleotidbindetasche führt und letztendlich die GDP-Freisetzung auslöst (zusammengefasst in Oldham & Hamm, 2008).

G $\alpha$ GTP dissoziiert vom aktiven Rezeptor (R\*) und von G $\beta\gamma$ , sodass R\* weitere Transducinmoleküle aktivieren kann. Dissoziiertes G $\alpha$ GTP wiederum aktiviert den Effektor der visuellen Signaltransduktion, die Phosphodiesterase (PDE), welche als tetrameres Protein an der Außenseite der Diskmembran über Isoprenylierungen am C-Terminus der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten verankert ist (Baehr et al., 1979; Hurley & Stryer, 1982; Catty et al., 1992; Qin et al., 1992).



**Abbildung 7: Signaltransduktion in der Stäbchenzelle**

Im Dunkeln sind der Photorezeptor Rhodopsin (R) und die Phosphodiesterase (PDE) inaktiv. Das von der Guanylatzyklase (GC) aus GTP hergestellte cGMP akkumuliert in der Stäbchenzelle und die cGMP-gesteuerten Ionenkanäle (CNGC) sind geöffnet, sodass ein Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Ioneneinstrom erfolgt. Über den stäbchenzellenspezifischen Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-K<sup>+</sup>-Austauscher (NCKX1) können die Ca<sup>2+</sup>-Ionen entgegen ihres Gradienten aus der Zelle transportiert werden. Die Absorption eines Photons (gelber Blitz) führt zur Aktivierung des Rezeptors (R\*, auch Meta IIb genannt), was einen GTP-GDP-Austausch des G-Proteins Transducin (G<sub>t</sub>) nach sich zieht. Dessen α-Untereinheit (Gα) aktiviert die PDE, die cGMP zu GMP hydrolysiert. Damit sinkt die cGMP-Konzentration, die CNGC schließen und das Transmembranpotenzial wird negativer (Hyperpolarisation) (modifiziert nach Lamb & Pugh, Jr., 2006).

Im Dunkeln binden zwei identische, inhibitorische γ-Untereinheiten die katalytischen α- und β-Untereinheiten der PDE, sodass keine Hydrolyse von zyklischem GMP (cGMP) stattfinden kann. Die Bindung von GαGTP an die membrangebundene PDE hebt den inhibitorischen Effekt der γ-Untereinheiten auf die katalytischen α- und β-Untereinheiten auf, sodass cGMP, welches zuvor von der membranassoziierten Guanylatzyklase (GC) über einen Ca<sup>2+</sup>-abhängigen Feedback-Mechanismus aus GTP gebildet wurde, zu GMP hydrolysiert wird. Ein aktivierter Rezeptor aktiviert *in vivo* etwa 20 bis 30 PDE-Moleküle (Lamb et al., 2018). Dies hat zur Folge, dass die Konzentration des cGMPs rasch abfällt und dass sich die cGMP-abhängigen Ionenkanäle schließen (zusammengefasst in Kaupp & Seifert, 2002). Diese nichtselektiven Kationenkanäle sind in der Plasmamembran lokalisiert und bilden die letzte Komponente der Phototransduktionkaskade. Der Dunkelstrom der Kanäle setzt sich aus etwa 85 % Na<sup>+</sup>- und 15 % Ca<sup>2+</sup>-Ionen zusammen. Na<sup>+</sup> wird über die Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase regelmäßig aus der Zelle gepumpt, wohingegen der

stäbchenzellenspezifische  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}\text{-K}^+$ -Austauscher (NCKX1)  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen entgegen ihres Gradienten aus der Zelle transportiert (zusammengefasst in Müller & Kaupp, 1998; Kaupp & Seifert, 2002; Fu & Yau, 2007). Die Stäbchenzelle wird so in der Dunkelheit auf etwa  $-40\text{ mV}$  depolarisiert, was dazu führt, dass ständig der Neurotransmitter Glutamat an der Synapse freigesetzt wird. Sind die cGMP-abhängigen Ionenkanäle jedoch geschlossen, reduziert sich der Einstrom von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen erheblich. Damit sinkt die Membranspannung (Hyperpolarisation) und zur Reduzierung der Glutamatfreisetzung führt (zusammengefasst in Makino et al., 2003). Über diese Enzymkaskade kann nach Photonenabsorption das cGMP schnell reduziert und die Zelle hyperpolarisiert werden. Auf je 100 Rhodopsinmoleküle kommen etwa zehn Transducin- und ein PDE-Molekül (zusammengefasst in Müller & Kaupp, 1998; Kaupp & Seifert, 2002; Fu & Yau, 2007).

### **1.1.5 Termination des Signalweges**

Nach der Lichtaktivierung muss die Signalkaskade deaktiviert und der Photorezeptor (R) regeneriert werden, um eine erneute Lichtanregung zu gewährleisten. Diese Wiederherstellung benötigt eine effiziente Inaktivierung jeder zuvor aktivierten Komponente ( $\text{R}^*$ ,  $\text{G}^*$ ,  $\text{PDE}^*$ ). Ebenso muss die cGMP-Konzentration wieder ansteigen.

#### **1.1.5.1 Inhibition des aktivierten Rezeptors**

Die Signalkaskade kann unterbrochen werden, indem der aktivierte Rezeptor ( $\text{R}^*$ ) gehemmt wird. Dafür sind zwei Proteine verantwortlich. Die Rhodopsinkinase (RK) konkurriert mit dem G-Protein um die Rezeptorbindestelle. Da Transducin jedoch etwa 100-mal häufiger in der Zelle als die RK vorkommt, werden zunächst viele G-Proteine aktiviert, bevor ein RK-Molekül bindet und den aktiven Rezeptor phosphoryliert. Verschiedene Serin- sowie Threoninreste im C-Terminus von Rhodopsin stellen hierbei potenzielle Phosphorylierungsstellen für die Rhodopsinkinase dar. Diese Phosphorylierung wird von dem zweiten Protein, namentlich Arrestin-1, erkannt. Es bindet den phosphorylierten, aktiven Rezeptor und inhibiert ihn, indem es sich wie eine Kappe um den cyto-

plasmatischen Bereich legt und somit die Meta IIb-vermittelte Signalamplifikation blockiert (Wilden et al., 1986; Kühn & Wilden, 1987, zusammengefasst in Fu & Yau, 2007). Die Rezeptorphosphorylierung wird in Abschnitt 1.1.7 ab Seite 17 genauer erläutert. Die Arrestin-Rhodopsin-Interaktion, die das Thema dieser Arbeit bildet, wird in Abschnitt 1.2 ab Seite 23 ausführlich beschrieben. Die langsame Regeneration und Dephosphorylierung von Rhodopsin schließen den Rhodopsinzyklus. Hierfür muss sich zunächst Arrestin wieder lösen, bevor eine Dephosphorylierung stattfinden kann (Hofmann et al., 1992).

Meta II zerfällt innerhalb Minuten entweder direkt oder über einen Zustand mit reprotomerisierter Schiff'schen Base (Meta III) in das Apoprotein Opsin und all-*trans*-Retinal. Ähnlich zum Meta I/Meta II-Gleichgewicht liegt auch das Apoprotein Opsin in einem Gleichgewicht aus inaktivem Opsin und aktivem Opsin (Ops\*) vor, wobei unter physiologischen Bedingungen fast ausschließlich inaktives Opsin vorkommt. Da die Photorezeptoren nicht in der Lage sind, Meta II photochemisch zu Rhodopsin zu reisoomerisieren, können sie nur mit frischem 11-*cis*-Retinal regeneriert werden, welches mit Opsin zusammen wieder das inaktive Rhodopsin bildet. Die Regeneration von 11-*cis*-Retinal wird in Abschnitt 1.1.6 ab Seite 16 erläutert.

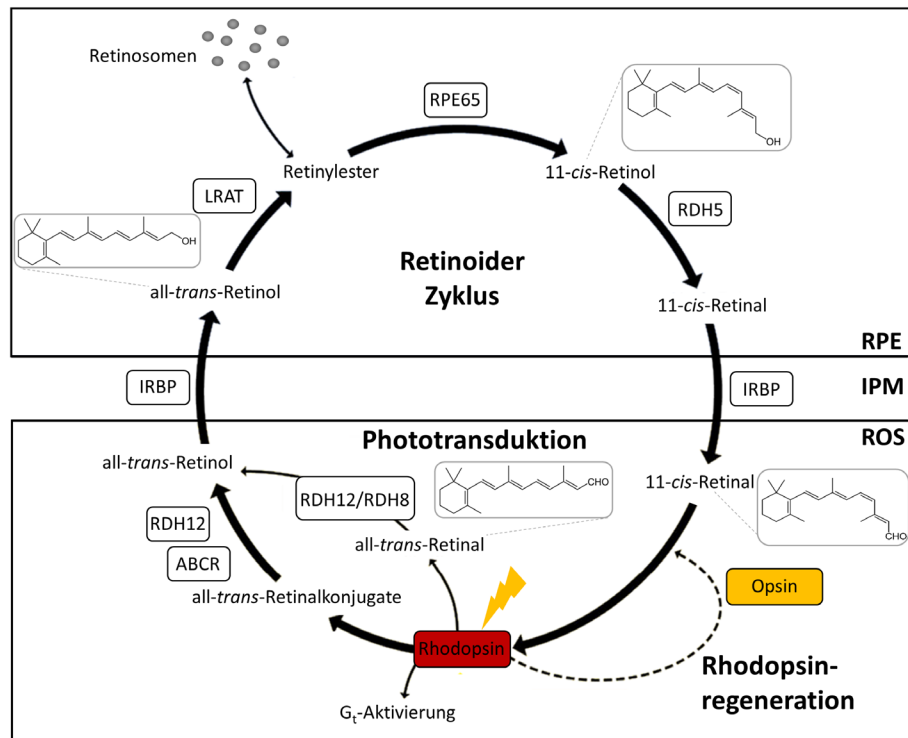
### **1.1.5.2 Inhibition der Signalkaskade**

Aktives Transducin (G\*) wird deaktiviert, indem das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert wird. Die langsame intrinsische GTPase-Aktivität von G $\alpha$ GTP wird durch die PDE zusammen mit einem GAP-Komplex (GAP für GTPase-aktivierende Proteine) beschleunigt. Dieser besteht aus RGS9-1 (RGS für Regulator des G-Protein-Signals) (He et al., 1998), der langen Form der G $\beta$ 5-Untereinheit (Makino et al., 1999) und dem Membranankerprotein R9AP (Hu & Wensel, 2002). Nach der Hydrolyse dissoziiert G $\alpha$ GDP von der PDE, sodass die katalytischen PDE $\alpha\beta$ -Untereinheiten wieder inhibiert werden (zusammengefasst in Makino et al., 2003). Weil die G\*-Deaktivierung etwa 2,5-mal langsamer als die R\*-Deaktivierung ist, limitiert die G\*-Deaktivierung die Geschwindigkeit der Beendigung der Ein-Photonen-Antwort (*single photon response*) der Stäbchenzellen (Krispel et al., 2006). Die Konzentration von freiem cGMP wird über die PDE-vermittelte Hydrolyse und die GC-vermittelte Synthese bestimmt. Zur Wiederherstellung der

Ausgangssituation in der Dunkelheit muss die cGMP-Konzentration wieder auf das ursprüngliche Niveau angehoben werden. Dafür sind in murinen Stäbchenzellen zwei Formen der GC zu finden: GC1 und GC2 (Liu et al., 1994; Cooper et al., 1995; Lowe et al., 1995). Die GC-Aktivität wird von  $\text{Ca}^{2+}$  über sogenannte Guanylatzyklase-aktivierende-Proteine (GCAPs) reguliert. Im Dunkeln vermittelt die relativ hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Bildung der  $\text{Ca}^{2+}$ -gebundenen GCAP-Form, welche die GCs inhibiert. Sinkt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Lichtanregung, aktiviert eine Dissoziation von  $\text{Ca}^{2+}$  vom GCAP die GCs, sodass die basale cGMP-Konzentration wiederhergestellt werden kann (zusammengefasst in Fu & Yau, 2007).

### **1.1.6 Visueller Retinalzyklus**

Nach Lichtaktivierung zerfällt der aktive, phosphorylierte Rezeptor (Meta IIb) zu Opsin und all-*trans*-Retinal (siehe Abbildung 6 auf Seite 11). Die retinale Schiff'sche Base hydrolysiert spontan, sodass das Retinal die Ligandenbindetasche verlassen kann (Hofmann et al., 1992). Damit wieder Rhodopsin gebildet wird, muss Opsin mit 11-*cis*-Retinal regeneriert werden (Retinalzyklus, siehe Abbildung 8). Dazu wird das aus dem Rhodopsin freigesetzte all-*trans*-Retinal zuerst durch die Retinoldehydrogenase zu all-*trans*-Retinol reduziert. Dieses diffundiert in das angrenzende Pigmentepithelium (RPE). Dort wird all-*trans*-Retinol zunächst katalytisch zu 11-*cis*-Retinol isomerisiert und anschließend zu 11-*cis*-Retinal oxidiert. 11-*cis*-Retinal diffundiert zurück in die Außensegmente, wo es in die Bindungstasche des Opsins gelangt, gebunden wird und nach Absorption eines Photons erneut isomerisieren kann (zusammengefasst in Palczewski, 2012).



**Abbildung 8: Der visuelle Retinalzyklus**

Nach Absorption eines Photons isomerisiert 11-*cis*-Retinal zu all-*trans*-Retinal, welches letztendlich aus der Retinalbindungstasche innerhalb des Opsins freigesetzt wird. Über den ABC-Transporter (ABCR) werden all-*trans*-Retinal und dessen Lipidkonjugate aus dem intradiskalen Bereich auf die cytosolische Seite der Diskmembranen transportiert, wo sie von der NADPH-abhängigen all-*trans*-Retinol-Dehydrogenase (RDH) zu all-*trans*-Retinol reduziert werden. Dieses diffundiert mithilfe des Interphotorezeptor-Retinoidbindepoteins (IRBP) durch die Interphotorezeptormatrix (IPM) zum retinalen Pigmentepithelium (RPE), wo es von der Lecithin:Retinol-Acyltransferase (LRAT) verestert wird. Die all-*trans*-Retinylester können dort entweder in Retinosomen (RESTS, *retinyl ester storage particles*) gelagert oder von RPE65 zu 11-*cis*-Retinol konvertiert werden, welches von RDH5 zu 11-*cis*-Retinal oxidiert wird. 11-*cis*-Retinal diffundiert zurück in die Stäbchenzelle, wo es Opsin bindet und die Regeneration zu Rhodopsin abschließt (modifiziert nach Kiser et al., 2012).

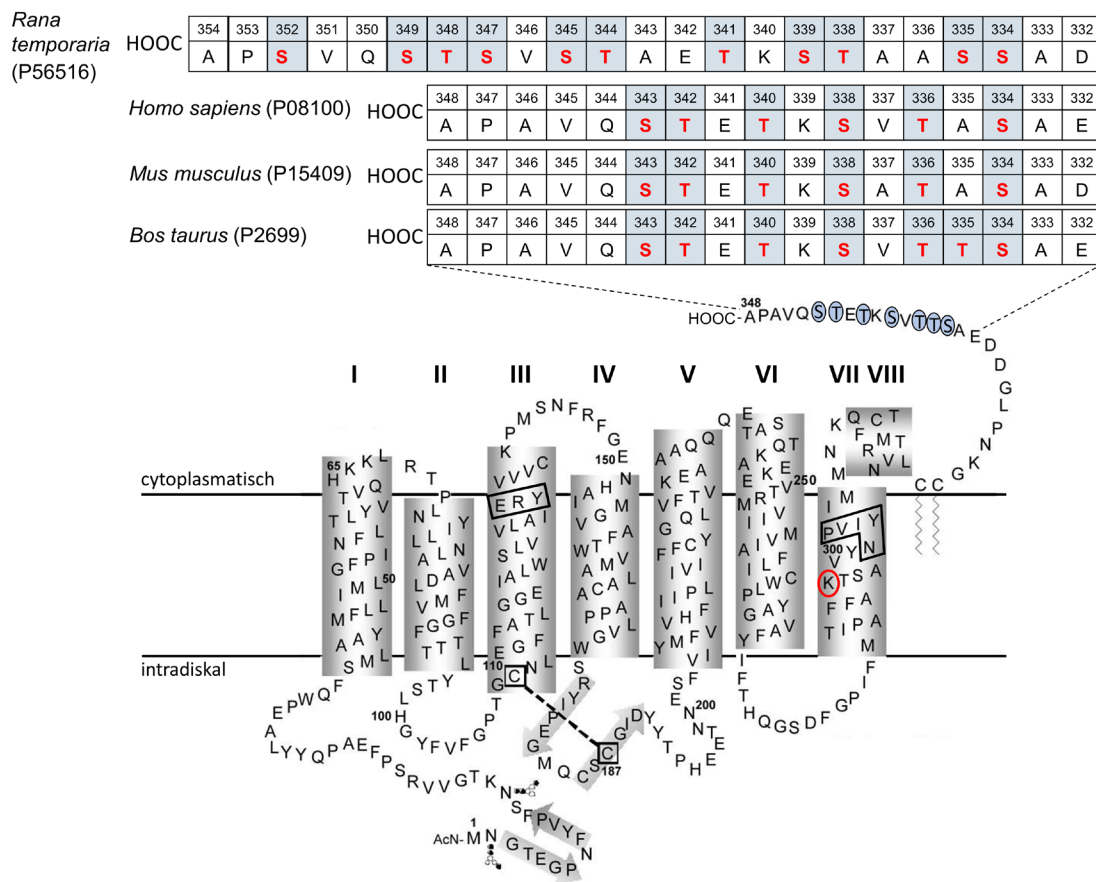
### 1.1.7 Phosphorylierung des aktiven Rezeptors

Desensibilisierung durch Phosphorylierung ist ein gängiger Mechanismus bei vielen GPCRs und wird über G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen katalysiert. Die sehr flexible C-terminale Region von Rhodopsin beinhaltet mehrere Serin- und Threoninreste (Thompson & Findlay, 1984), die nach Photoisomerisierung des Rezeptors durch die

Rhodopsinkinase phosphoryliert werden können (Hurley et al., 1998; Kennedy et al., 2001). Mittels radioaktivem ATP gelang es, *in vitro* bis zu neun phosphorylierte Reste in R\* zu identifizieren (Wilden & Kühn, 1982). Hargrave und Kollegen zeigten, dass sieben potenzielle Phosphorylierungsstellen (drei Serin- & vier Threoninreste) im C-Terminus des bovinen Rezeptors nah bei einander lokalisiert vorliegen (1980). Zwei weitere Phosphorylierungsstellen sind in den cytoplasmatischen Schleifen lokalisiert (Hargrave et al., 1980; Wilden & Kühn, 1982), wobei die physiologische Rolle dieser Phosphorylierungen bisher nicht geklärt ist. Die Anzahl an potenziellen Phosphorylierungsstellen im Rezeptor-C-Terminus ist bei den verschiedenen Tierarten unterschiedlich. Im Gegensatz zu den sieben potenziellen Phosphorylierungsstellen im bovinen Rhodopsin weisen der murine und der humane sechs bzw. der C-Terminus aus Frosch-Rhodopsin elf auf (siehe Abbildung 9).

Die Rhodopsinkinase (RK) gehört zur Familie der zyklischen Nukleotid-unabhängigen Rezeptorkinasen. Sie hat eine molekulare Masse von 67 kDa, ist in den Außensegmenten der Stäbchen- und Zapfenzellen lokalisiert und ist hochspezifisch für Rhodopsin. Ihr bevorzugtes Nukleotid ist ATP (Palczewski et al., 1993). Für die Interaktion ist eine Farnesylierung der Kinase unabdingbar (Inglese et al., 1992). Die katalytische Region der RK befindet sich in der Mitte der Polypeptidkette und ist hochkonserviert unter den Ser/Thr-Kinasen. Sie beinhaltet u.a. das sogenannte „GXGXXGX“-Motiv und die ATP-Bindestelle. Die N-terminale Region spielt eine entscheidende Rolle in der Substraterkennung (zusammengefasst in Maeda et al., 2003). Die C-terminale Domäne weist Autophosphorylierungsstellen an den konservierten Ser/Thr-Resten auf (Ser<sup>488</sup> & Thr<sup>489</sup> bei der bovinen RK1; Ser<sup>490</sup> bei der humanen RK7) (Palczewski et al., 1992). Es wird vermutet, dass die Affinität der RK für R\* durch die Autophosphorylierung abgeschwächt wird, sodass eine Dissoziation auftreten kann, um eine Arrestinbindung zu ermöglichen (zusammengefasst in Sokal et al., 2002). Zunächst bindet die RK einen ATP-Mg<sup>2+</sup>-Komplex (Palczewski et al., 1988), welcher dann die Assoziationsrate  $k_{on}$  für den aktivierten Rezeptor R\* um den Faktor zehn steigert (Pulvermüller et al., 1993). Anschließend erkennt und bindet sie R\* im gleichen hydrophoben Bereich auf H-V, der auch von dem C-Terminus der  $\alpha$ -Untereinheit des Transducins sowie von Arrestin-1 gebunden wird (Brunette et al., 2016), und phosphoryliert die entsprechenden Ser/Thr-Reste im C-Terminus (zusammengefasst in Maeda et al., 2003).





**Abbildung 9: Rhodopsin mit potenziellen Phosphorylierungsstellen im C-Terminus**

(Oben) Im C-Terminus von Rhodopsin gibt es unterschiedlich viele potenzielle Phosphorylierungsstellen (rot hervorgehoben): bovin: sieben; human/murin: sechs; Frosch: elf. Die UniProtKB-Eintragsnummern sind in Klammern aufgeführt.

(Unten) Sekundärstrukturen von bovinem Rhodopsin: sieben Transmembranhelices und eine cytoplasmatische Helix in nummerierten grauen Boxen (I bis VIII),  $\beta$ -Faltblätter in grauen Pfeilen. Die gestrichelte Linie zeigt die Disulfidbrücke zwischen Cys<sup>110</sup> und Cys<sup>187</sup>. Wichtige Motive (ERY und NPXXY) sind mit schwarzem Rahmen hervorgehoben, Lys<sup>296</sup> für die Schiff'sche Base zur Retinalbindung ist mit rotem Kreis markiert. Die sieben möglichen Phosphorylierungsstellen (bovin) für die Rhodopsinkinase am C-terminalen Ende auf der cytoplasmatischen Seite der Membran sind mit blauen Kreisen dargestellt (modifiziert nach Rader et al., 2004).

Der R\*-RK-Komplex involviert die N-terminale Kinasedomäne und die cytoplasmatischen Schleifen des Rezeptors. Sowohl eine Phosphorylierung des Rezeptors als auch der Kinase erhöhen die Dissoziationsrate  $k_{\text{off}}$  des Komplexes (Pulvermüller et al., 1993).

Die Phosphorylierungen erfolgen sequenziell; die Reihenfolge *in vivo* wird kontrovers diskutiert und hängt vermutlich von den Bedingungen (z.B. Anzahl der aktivierten Rezeptoren) ab. Verschiedene Forschergruppen zeigten *in vitro*, dass die Phosphorylierung an Ser<sup>338</sup> und Ser<sup>343</sup> beginnt (McDowell et al., 1993; Papac et al., 1993; Ohguro et al., 1993). *In vivo* wurden drei Ser-Reste (Ser<sup>336</sup>, Ser<sup>338</sup>, Ser<sup>343</sup>) identifiziert, die nach 20 % bis 40 % Rezeptoraktivierung phosphoryliert werden (Ohguro et al., 1995 & 1996). Auch Kennedy und Kollegen zeigten an intakten Mausretinae massenspektrometrisch, dass der aktive Rezeptor an den oben erwähnten Resten mehrfach phosphoryliert wurde (Kennedy et al., 2001). Sowohl die Phosphorylierung bei Ser<sup>343</sup> und Ser<sup>338</sup> als auch die Dephosphorylierung bei Ser<sup>338</sup> und Ser<sup>343</sup> erfolgt schneller als bei Ser<sup>334</sup>. Zum Beispiel erfolgt eine Dephosphorylierung bei Ser<sup>338</sup> innerhalb von 30 min, wohingegen Ser<sup>334</sup> wesentlich langsamer dephosphoryliert wird (bis zu 60 min). Dies könnte dazu führen, dass verschiedene phosphorylierte Reste auch verschiedene Rollen innerhalb der Phototransduktion spielen (Kennedy et al., 2001; zusammengefasst in Maeda et al., 2003). Experimente mit genmanipulierten Mäusen haben gezeigt, dass ebendiese potenziellen Aminosäurereste für eine normale Abschaltungskinetik des Rezeptors nötig sind, was hieße, dass mindestens drei Phosphate am C-Terminus für eine reproduzierbare R\*-Deaktivierung benötigt werden (Mendez et al., 2000). So bindet G<sub>t</sub> umso schlechter an Meta II, je höher das Phosphorylierungsniveau des Rezeptors ist, wohingegen bei höheren Phosphorylierungen die Arrestinbindung bevorzugt auftritt (Gibson et al., 2000). Wenn Arrestin an pMeta II (phosphoryliertes Meta II) gebunden ist, wird die Bindung und Aktivierung von Transducin blockiert, sodass keine Signalweiterleitung mehr stattfinden kann (Wilden et al., 1986). Stand der Forschung ist, dass der Rezeptor von der Proteinphosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert wird (Fowles et al., 1989; Palczewski, et al., 1989 (A); Kolesnikov et al., 2017). Eine Dephosphorylierung des Rhodopsins durch die PP2A tritt erst nach dem Zerfall des photoaktivierten Proteins auf, welcher *in vivo* von Arrestin reguliert wird (Palczewski et al., 1989 (B)). Während der Dunkeladaptation tritt die Dephosphorylierung von Rhodopsin in zwei Phasen auf. Die Dephosphorylierung erfolgt während der Regeneration des Rhodopsins nur langsam, nach Regeneration des Rezeptors dagegen schneller (Lee et al., 2010). Somit unterscheidet sich das Phosphorylierungsmuster während der Dunkeladaptation von dem im Dauerlicht. Eine komplette Dephosphorylierung dauert

länger als die Dunkeladaptation und benötigt in Mäuseretinae mehr als drei Stunden in kompletter Dunkelheit (Berry et al., 2016).

### 1.1.8 Rhodopsin als Dimere?

Während längst bekannt ist, dass GPCRs der Klasse C (z.B. Geschmacksrezeptoren für süß und umami) konstitutive Homo- und Heterodimere zur Aktivierung bilden (zusammengefasst in Kniazeff et al., 2011), ging man lange Zeit davon aus, dass Rhodopsin für die Signaltransduktion als Monomer vorliegt. Über Studien mit monomeren Rezeptoreinheiten in sogenannten Nanodisks konnte gezeigt werden, dass Rhodopsin als Monomere wirken kann (Bayburt et al., 2007; Whorton et al., 2007 & 2008). Ebenso kann solubilisiertes, monomeres Rhodopsin das G-Protein Transducin bei seinem Diffusionslimit aktivieren (Ernst et al., 2007). In den letzten zwanzig Jahren gab es auch erste Hinweise, dass Rhodopsin ebenfalls Dimere bilden kann. Bislang ist es umstritten, ob Rhodopsin *in vivo* Dimere oder sogar höhere Oligomere bildet. Schätzungsweise 25.000 Rhodopsinmoleküle pro  $\mu\text{m}^2$  wird als Packungsdichte angegeben (Übersicht in Fu & Yau, 2007). Die hohe Dichte erhöht die Wahrscheinlichkeit des Einfangens der Photonen. Mithilfe der Rasterkraftmikroskopie wurde gezeigt, dass murines Rhodopsin in dichten Reihen als Dimer organisiert mit einer Packungsdichte von 33.000 bis 55.000 Monomeren pro  $\mu\text{m}^2$  vorliegt (Fotiadis et al., 2003). Buzhynskyy und Kollegen untersuchten mit der gleichen Methode die supramolekulare Struktur von bovinen Diskmembranen und fanden eine ungleiche Rhodopsinverteilung innerhalb der Disks. Ihnen zufolge liegen die Rhodopsinmoleküle nur locker gepackt in der zentralen Region der Diskmembranen vor, welche von den dichteren peripheren Domänen über einen proteinfreien Lipidgürtel getrennt ist. Die von ihnen bestimmte Rhodopsindichte fällt mit etwa 26.000 Molekülen pro Disk jedoch geringer aus, wenn Rhodopsin als Dimer in Reihen vorliegt (Buzhynskyy et al., 2011). Eine quantitative Analyse von 150 Diskmembranen zeigte, dass Rhodopsin oligomere Komplexe in dicht gepackten Nanodomänen bildet (Whited and Park, 2015). Damit übereinstimmend wurde mittels Kryo-EM gezeigt, dass Rhodopsin hierarchisch organisiert als Dimere vorliegt, welche feste Reihen bilden (Gunkel et al., 2015). Aus diesen Reihen werden wiederum Doppelreihen gebildet, welche parallel zu den Diskeinschnürungen verlaufen. Grundlage der Experimente waren intakte Mausretinae, welche nach

schockartigem Einfrieren konserviert vorliegen. Es wird nun spekuliert, dass die an dem Rhodopsin-Signalweg beteiligten Komponenten bereits räumlich an den supramolekularen Strukturen organisiert vorliegen und dass die räumliche Nähe die Signalweitergabe beschleunigen würde (Gunkel et al., 2015). Schöneberg und Kollegen zeigten dagegen mittels partikelbasierten Diffusionssimulationen, dass Dimerreihen von Rhodopsin sehr effizient den Rezeptor immobilisieren würden, was bedeutet, dass eine schnelle Aktivierung von  $G_t$  nach Photoisomerisierung von Rhodopsin eingeschränkt wäre (Schöneberg et al., 2014).

Somit bleibt es weiterhin strittig, ob Rhodopsin als diffusionsfähiges Monomer vorliegt, Dimere, oder sogar immobile „feste Dimer-Schienen“ bildet (oder ob die verschiedenen Formen durch bisher unbekannte Faktoren ineinander überführt werden können) und welche Funktion diese hypothetischen Oligomere haben könnten. Die widersprüchlichen Ergebnisse könnten auch auf die verwendeten Rhodopsinproben zurückgeführt werden, die von den unterschiedlichen Parametern (wie Temperatur, Präparation und Messmethoden) stark beeinflusst werden (Chabre et al., 2003; Gunkel et al., 2015).

### **1.1.9 Lipidzusammensetzung der Diskmembran**

ROS-Membranen bestehen zu etwa 50 % aus Protein und 50 % aus Lipiden. Die Gesamtlipide bestehen zu 90 % bis 95 % (w/w) aus Phospholipiden und nur zu 4 % bis 6 % (w/w) aus Cholesterol. Der ungewöhnlich geringe Cholesterolanteil verursacht eine hohe Fluidität der Diskmembran. Die Hauptphospholipide der bovinen Diskmembran sind Phosphatidylethanolamin (PE, mit etwa 32 mol pro mol Rho), Phosphatidylcholin (PC, mit etwa 30 mol pro mol Rho) und Phosphatidylserin (PS, mit etwa 11 mol pro mol Rho). Die Phospholipide sind hauptsächlich mehrfach ungesättigt und haben vorwiegend eine Länge von 20 bis 22 Kohlenstoffatomen (Miljanich et al., 1981; Wang & Anderson, 1992). Der äußere Monolayer der Diskmembran weist zudem einen höheren Anteil an ungesättigten Fettsäuren auf als der innere (zusammengefasst in Giusto et al., 2000).

## 1.2 Arrestin-Rhodopsin-Interaktion

### 1.2.1 Arrestin

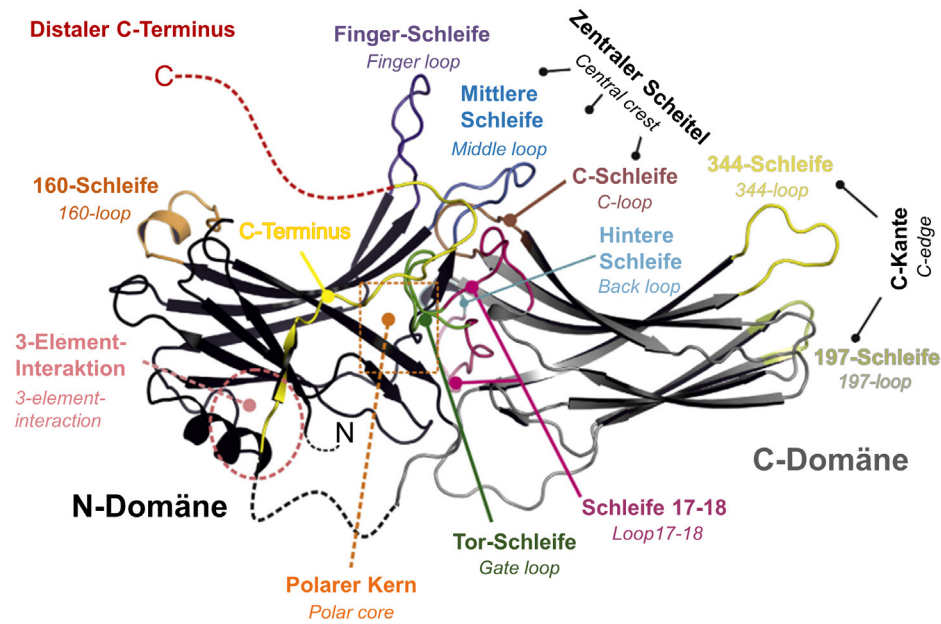
Die Arrestin-Proteinfamilie wird aus vier verschiedenen Arrestin-Typen gebildet, die sich sehr in ihrer Struktur ähneln und die über 800 bisher entdeckten GPCRs regulieren. Während Arrestin-1 (auch S-Antigen (Pfister et al., 1985), 48 kDa-Protein, visuelles oder Stäbchenarrestin genannt) und Arrestin-4 (Zapfen- oder X-Arrestin) ausschließlich in den Stäbchen- und Zapfenzellen vorkommen, werden Arrestin-2 und Arrestin-3 ( $\beta$ -Arrestin-1 und  $\beta$ -Arrestin-2) ubiquitär exprimiert und sind in der Lage, mit vielen verschiedenen GPCRs zu interagieren (zusammengefasst in Lohse & Hoffmann, 2014).

Hauptfunktion der Arrestine ist es, nach Phosphorylierung den aktivierten GPCR zu binden, um so die G-Proteinbindung zu unterbinden und damit eine aktive Signalweiterleitung zu inhibieren (zusammengefasst in Gurevich & Gurevich, 2006). Zudem können  $\beta$ -Arrestine über die Bindung von Clathrin und dem Adapterprotein AP-2 eine Internalisierung des Rezeptors auslösen sowie über die Bindung von anderen Signalmolekülen wie z.B. Transkriptionsfaktoren, Kinasen oder Phosphatasen, auch über nicht-GPCR-vermittelte Signalwege wirken (Xiao et al., 2007, zusammengefasst in Kang et al., 2014).

Die Analyse der cDNA ergab, dass bovines Arrestin-1 eine molekulare Masse von 45,5 kDa hat (Shinohara et al., 1987). Bei einer speziellen Autoimmunerkrankung werden Antikörper gegen Arrestin gebildet, was eine Zerstörung der Photorezeptoren nach sich ziehen kann und zur Erblindung führt. Es existieren zwei Spleißvarianten von Arrestin-1: basales Arrestin (p48) und die C-terminal trunkierte Form p44 ( $\text{Arr}^{1-370\text{A}}$ ), die den aktivierten phosphorylierten Rezeptor schneller als p48 bindet (Palczewski, 1994; Smith et al., 1994; Langlois et al., 1996).

Die erste Kristallstruktur von nativem bovinen Arrestin-1 wurde im Jahr 1998 gelöst (Granzin et al., 1998). Bereits ein Jahr danach wurde die Struktur des rekombinant hergestellten Arrestin-1 mit höherer Auflösung veröffentlicht (Hirsch et al., 1999), welche in Abbildung 10 gezeigt und im Folgenden näher erläutert wird:

Arrestin besteht aus zwei nahezu symmetrischen Keulen (*lobes*), die N- und C-Domäne genannt werden. Jede dieser Domänen besteht aus einem siebensträngigen  $\beta$ -Faltblatt, welches sich wiederum aus zwei Lagen antiparalleler  $\beta$ -Faltblätter zusammensetzt.



**Abbildung 10: Struktur von basalem Arrestin-1**

Arrestin unterteilt sich in N-Domäne (schwarz) und C-Domäne (grau). Die im Text beschriebenen Schleifen sind in verschiedenen Farben gezeigt. Nicht in der Struktur aufgelöste Teile des Proteins sind mit gestrichelten Linien dargestellt. Polarer Kern, 3-Element-Interaktion, zentraler Scheitel sowie C-Kante sind mit gestrichelten Boxen hervorgehoben. Das Strukturmodell bezieht sich auf die Kristallstruktur von Hirsch et al., 1999 (PDB-Eintrag: 1CF1; modifiziert nach Scheerer & Sommer, 2017).

Die Interdomänenverbindung bildet eine Art Gelenk (*hinge region*) zwischen den beiden Hauptdomänen. Zusätzlich beinhaltet die N-Domäne (schwarz in Abbildung 10; Val<sup>8</sup> bis Pro<sup>180</sup>)<sup>2)</sup> eine kurze  $\alpha$ -Helix auf der konvexen Seite. Die C-Domäne (grau in Abbildung 10; Arg<sup>188</sup> bis His<sup>362</sup>) ist mit dem C-Terminus (gelb-rot in Abbildung 10; Val<sup>372</sup> bis Arg<sup>418</sup>) verbunden, welcher innerhalb der Kristallstrukturen aufgrund seiner hohen Flexibilität unaufgelöst bleibt, jedoch extensiv mit der N-Domäne innerhalb des polaren Kerns (*polar core*, orange-gestrichelt in Abbildung 10) und der 3-Element-Interaktion (*3-element-interaction*, rosa gestrichelt in Abbildung 10) in Wechselwirkung tritt (Granzin et al., 1998; Hirsch et al., 1999, Vishnivetskiy et al., 1999).

Der aus 32 Aminosäuren bestehende C-Terminus agiert als autoregulatorisches Element, welches das Protein in seiner basalen, inaktiven Konformation hält und nach Interaktion

<sup>2)</sup> Die Aminosäurerest-Benummerung in diesem Abschnitt bezieht sich auf bovines Arrestin-1.

mit dem Rezeptor ersetzt wird (Smith et al., 1994; Pulvermüller et al., 1997). Der C-Terminus ist in der N-Domäne u.a. in der hydrophoben 3-Element-Interaktion (Vishnivetskiy et al., 2000) und einer Salzbrücke zum zentralen Arg<sup>175</sup> des polaren Kerns verankert. Im basalen Zustand kann Arrestin den aktiven Rezeptor nicht mit hoher Affinität binden. N- und C-Domäne werden über hydrophobe Interaktionen und ein Netzwerk aus Wasserstoffbrücken stabilisiert, die den polaren Kern umschließen (Hirsch et al., 1999; Vishnivetskiy et al., 1999).

Der polare Kern (*polar core*) besteht aus einem Bündel (*cluster*) an geladenen Aminosäureresten, welches zwischen der N- und C-Domäne sitzt. Es umschließt die Reste Asp<sup>30</sup>, Arg<sup>175</sup>, Lys<sup>176</sup>, die Tor-Schleifen (*gate loop*)-Reste Asp<sup>296</sup>, Asp<sup>303</sup> sowie das Arg<sup>382</sup> im C-Terminus. Das Bündel wird von Salzbrücken stabilisiert, welche ebenfalls die basale Konformation des Arrestins stabilisieren. Ein Entfernen des C-Terminus führt zum Aufbrechen des polaren Kerns und einer Bewegung der Tor-Schleife (grün in Abbildung 10), welche aus den Resten Asp<sup>296</sup> bis Asn<sup>305</sup> gebildet wird (Hirsch et al., 1999; Kim et al., 2013; Shukla et al., 2013).

Die 3-Element-Interaktion bezeichnet eine hydrophobe Interaktion zwischen  $\beta$ -Strang I (Val<sup>11</sup>, Iso<sup>12</sup>, Phe<sup>13</sup>) und  $\alpha$ -Helix I (Leu<sup>103</sup>, Leu<sup>107</sup>, Leu<sup>111</sup>) der N-Domäne und dem C-Terminus (Phe<sup>375</sup>, Val<sup>376</sup>, Phe<sup>377</sup>) von Arrestin (Vishnivetskiy et al., 2000). Zusätzlich zum polaren Kern sorgt diese Interaktion ebenfalls für Stabilisierung der inaktiven Arrestinkonformation (Hirsch et al., 1999; Vishnivetskiy et al., 1999).

Die Finger-Schleife (*finger loop*) der N-Domäne (violett in Abbildung 10) wird von den Resten Gly<sup>68</sup> bis Ser<sup>78</sup> gebildet und beschreibt eine flexible Schleife, welche den aktiven Rezeptor besetzt (Hanson et al., 2006; Sommer et al., 2012; Szczepek et al., 2014; Kang et al., 2015, zusammengefasst in Scheerer & Sommer, 2017). Die Schleifen des zentralen Scheitelpunkts (*central crest*) umschließen sowohl die bisher beschriebene Finger-Schleife mit dem Schlüssel-Rezeptor-Bindeelement (*key receptor-binding element*) als auch die mittlere Schleife (*middle loop*, Gln<sup>133</sup> bis Ser<sup>142</sup>; blau in Abbildung 10) und die C-Schleife (*C-loop*, Val<sup>247</sup> bis Tyr<sup>254</sup>; rotbraun in Abbildung 10). Die Schleife 17-18 (*loop17-18*, pink in Abbildung 10) wird von Asn<sup>287</sup> bis Asp<sup>317</sup> gebildet. All diese Schleifen liegen auf der Interdomänenoberfläche und bilden verschiedene Interaktionspunkte zwischen den zwei Domänen der basalen Arrestinkonformation. Nach Arrestinaktivie-

rung unterlaufen sie eine Reorientierung und interagieren dann mit den spezifischen Stellen innerhalb des aktiven Rezeptors (Kim et al., 2013; Shukla et al., 2013, zusammengefasst in Scheerer & Sommer, 2017).

Die distale C-Kante (*C-edge*) besteht aus der 344-Schleife (*344-loop*, Ser<sup>336</sup> bis Ser<sup>344</sup>; dunkelgelb in Abbildung 10) und der 197-Schleife (*197-loop*, Phe<sup>197</sup> bis Pro<sup>202</sup>; grüngrau in Abbildung 10) (zusammengefasst in Scheerer & Sommer, 2017). Die 160-Schleife (*160-loop*) der distalen N-Kante (ocker in Abbildung 10) besteht aus den Resten His<sup>155</sup> bis Pro<sup>165</sup>. Sie ist ebenfalls flexibel und beinhaltet viele geladene Aminosäurereste. Unter ihnen befinden sich die sauren Reste Glu<sup>160</sup>, Glu<sup>161</sup> sowie Asp<sup>162</sup>, welche direkt an das basische Lys<sup>163</sup> angrenzen. Diese Schleife wird als potenzielle Interaktionsseite mit Rhodopsin beschrieben (Shukla et al., 2014; Kang et al., 2015, zusammengefasst in Scheerer & Sommer, 2017). Im Folgenden wird ausschließlich auf Arrestin-1 eingegangen. Aus Gründen der leichten Lesbarkeit wurde deshalb durchgängig jeweils die verkürzte Benennung „Arrestin“ oder die Abkürzung „Arr“ gewählt; gleichwohl beziehen sich sämtliche Angaben auf die ursprüngliche Benennung Arrestin-1.

## 1.2.2 Arrestin-Rhodopsin-Bindung

Nach Illumination migriert Arrestin aus den Innensegmenten in die Außensegmente (zusammengefasst in Calvert et al., 2006). Die Interaktion mit dem aktivierten und phosphorylierten Rezeptor aktiviert Arrestin (zusammengefasst in Gurevich & Gurevich, 2014). Basierend auf Studien mit mutiertem Arrestin (zusammengefasst in Gurevich et al., 2011) und Kristallstrukturen des prä-aktivierten Arrestins (Shukla et al., 2013; Kim et al., 2013), erfolgt die Komplexbildung wie folgt (Schröder et al., 2002; Kirchberg et al., 2011; Kumari et al., 2016; zusammengefasst in Scheerer & Sommer, 2017, siehe Abbildung 11 auf Seite 28 sowie Abbildung 12 auf Seite 29):

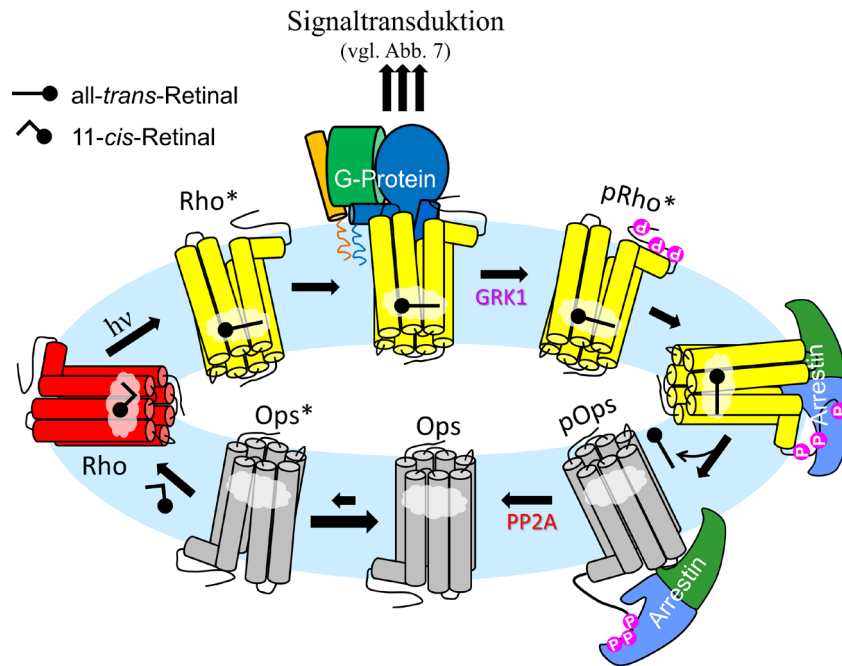
Die pRho-Bindung der phosphatbindenden Aminosäurereste auf dem  $\beta$ -Strang I der N-Domäne des Arrestins bricht die 3-Element-Interaktion auf, welche den autoinhibitorischen C-Terminus des Arrestins freigibt und dadurch den polaren Kern aufbricht. Der Arrestin-C-Terminus beinhaltet 16 negativ geladene Aminosäurereste (Asp & Glu), ist aber auch hochflexibel, sodass er bisher in keiner der Kristallstrukturen aufgelöst werden



konnte. Er hält Arrestin in einer basalen, inaktiven Konformation, die keine Rhodopsinbindung mit hoher Affinität zulässt. Seine Verdrängung zieht nun eine Reihe von strukturellen Veränderungen innerhalb des Arrestins nach sich: Die Wechselwirkung der Phosphate des Rezeptor-C-Terminus‘ mit einer Reihe von basischen Aminosäureresten der N-Domäne des Arrestins führt zu einem Präkomplex, welcher nur eine geringe Affinität aufweist (Palczewski et al., 1991; Gurevich & Benovic, 1995). Der phosphorylierte C-Terminus des Rhodopsins bildet mit den N-terminalen  $\beta$ -Strängen des Arrestins ein erweitertes intermolekulares  $\beta$ -Faltblatt. Die Phosphorylierung von Thr<sup>336</sup> und Ser<sup>338</sup> bilden zusammen mit Glu<sup>341</sup> ein umfangreiches Netzwerk an elektrostatischen Interaktionen mit drei positiv geladenen Taschen innerhalb des Arrestins (Zhou et al., 2017).

Beide Arrestin-Domänen rotieren nach dem Aufbruch des polaren Kerns um etwa 21° gegeneinander. Dabei kommt die C-Kante in Kontakt mit der Diskmembran (Sommer et al., 2006; Kang et al., 2015; Lally et al., 2017). Die Finger-Schleife kippt nach vorn und kann dann mit dem Rezeptorkern interagieren, was den Zugang für die G $\alpha$ -Untereinheit des Transducins blockiert, sodass keine Signalweiterleitung mehr stattfinden kann (Hanson et al., 2006; Sommer et al., 2012; Szczepek et al., 2014; Kang et al., 2015). Dies führt zu einer festeren Bindung des Rezeptors (zusammengefasst in Scheerer & Sommer, 2017). Die 2015 veröffentlichte Kristallstruktur des Komplexes aus konstitutiv-aktivem humanen Opsin fusioniert an ein konstitutiv-aktives murines Arresin (Ops\*/Arr) und lässt vermuten, wie Konformationsänderungen die Kopplung von Arrestin an das helikale Bündel des aktiven Rezeptors ermöglichen (Kang et al., 2015). Allerdings mussten für die Kristallisation des Komplexes viele Hindernisse überbrückt werden. Die Verwendung der konstitutiv-aktiven Rhodopsinmutante (E113Q, M257Y) gewährleistete in Abwesenheit des all-*trans*-Retinals eine aktive Rezeptorkonformation (Ops\*), welche jedoch unphosphoryliert vorlag. Um letzteres zu kompensieren, wurde eine konstitutiv-aktive, phosphatunabhängige Arrestinmutante (L374A, V375A, F376A) verwendet. Erst nach Verknüpfung beider Proteine mithilfe von 15 Aminosäuren zu einem Fusionsprotein und einer Fusion mit T4-Lysozym konnte schließlich eine Kristallstruktur erhalten werden (Kang et al., 2015). Mindestens fünf positiv geladene Lys- und Arg-Reste in den  $\beta$ -Faltblättern 5 und 6 des N-Terminus‘ des Arrestins interagieren mit den negativ geladenen Phosphaten des phosphorylierten Rezeptors. Ebendiese fünf positiv geladenen Reste

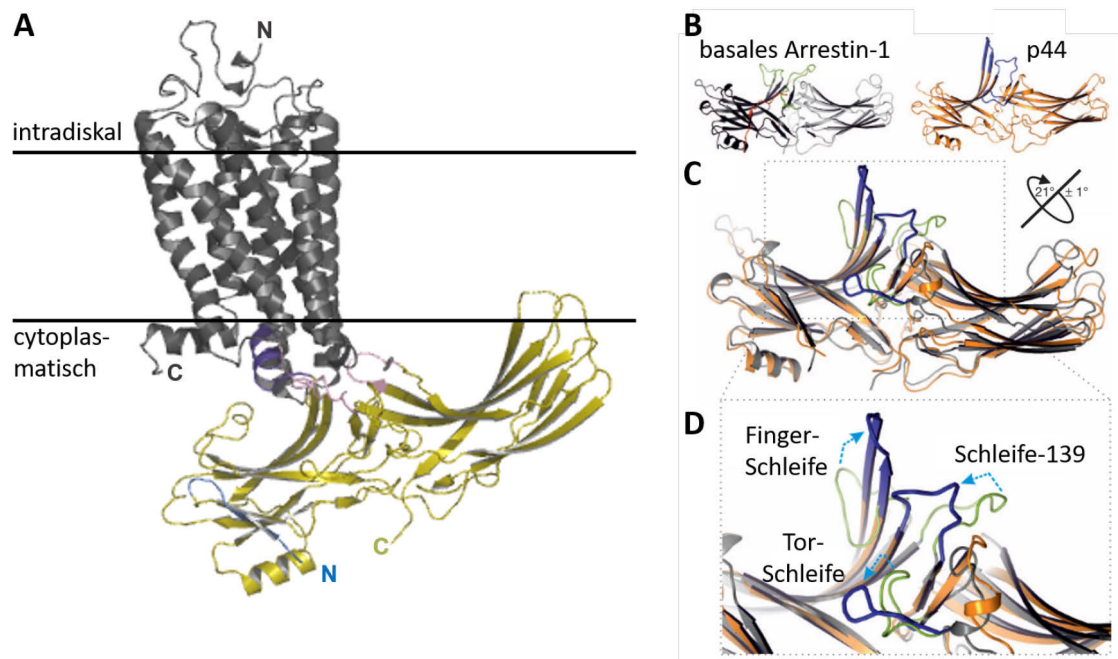
könnten also die Bildung eines besonders stabilen Komplexes (auch *High-Affinity*-Komplex genannt), aus  $pR^*$  und Arrestin ermöglichen, sofern mindestens drei Phosphate unabhängig ihrer Lokalisation am Rezeptor-C-Terminus gebunden sind (Vishnivetskiy et al., 2000).



**Abbildung 11: Aktivierung und Deaktivierung von Rhodopsin**

Nach Belichtung ( $h\nu$ ) wird Rhodopsin (Rho) aktiviert ( $Rho^*$ ), bindet und aktiviert das G-Protein Transducin, welches dissoziiert und über eine in Abbildung 7 beschriebene Signalkaskade die Hyperpolarisation der Zelle auslöst. Zum Deaktivieren wird der aktive Rezeptor erst von der Rhodopsinkinase (RK) phosphoryliert, was zur Arrestinbindung führt. Nach Freisetzung von all-*trans*-Retinal dissoziiert das Arrestin und der Rezeptor wird von der Proteinphosphatase 2A (PP2A) dephosphoryliert. Das Apoprotein Opsin (Ops) liegt in einem Gleichgewicht zwischen Ops- und Ops\*-Konformation vor. Mit Aufnahme von 11-*cis*-Retinal in die Retinalbindetasche von Ops\* wird der inaktive Rezeptor (Rho) regeneriert. Diese Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. Martha E. Sommer zur Verfügung gestellt (unveröffentlicht).

Arrestin kann sogar inaktives, phosphoryliertes sowie aktives, unphosphoryliertes Rhodopsin mit geringerer Affinität binden. Diese Beobachtungen waren erste Hinweise darauf, dass Arrestin den Aktivierungs- und Phosphorylierungszustand von Rhodopsin unabhängig voneinander erkennen kann (Gurevich & Benovic, 1993; Zhuang et al., 2013).



**Abbildung 12: Arrestin-Interaktionen**

(A) Kristallstruktur des Ops\*-Arrestin-Komplexes: Hauptinteraktionen mit Ops\* (grau) innerhalb des Arrestins (gelb) sind in der Finger-Schleife (lila) sowie in Mittelschleife und C-Schleife (rosa). Der distale N-Terminus (blau) interagiert vermutlich mit dem Rezeptor-C-Terminus (nicht aufgelöst). PDB-Eintrag: 4ZWJ (Kang et al., 2015). (B bis D) Strukturelle Unterschiede zwischen basalem Arrestin-1 (PDB-Eintrag: 1CF1, grau) und prä-aktiviertem, C-terminal trunkierten p44 (PDB-Eintrag: 4J2Q, orange) einzeln (B) und überlagert mit dargestellter Interdomänenrotation von  $21^\circ \pm 1^\circ$  (C). (D) Vergrößerte Ansicht der Scheitelpunktregion der überlagerten Darstellung beider Proteine. Hellblaue Pfeile verdeutlichen die strukturellen Änderungen innerhalb Finger-Schleife, Schleife-139 und Tor-Schleife (modifiziert nach Kim et al., 2013).

Interaktionen von Arrestin mit verschiedenen Photorezeptorformen von Rhodopsin (pOps als phosphoryliertes Apoprotein sowie pRho als lichtaktivierte, phosphorylierte, Agonist-gebundene Form) zeigten, dass sowohl der Aufbruch des polaren Kernbereiches als auch die Verdrängung des C-Terminus‘ des Arrestins die Bindung des Rezeptors verstärkten. Mutationen innerhalb der phosphatbindenden Aminosäurereste („Phosphosensoren“) führen zu unterschiedlichen Bindungen von pOps und pRho, woraus man schließen kann, dass die Arrestinbindung von pOps und pRho anders erfolgt, weil es anders aktiviert wird (Peterhans et al., 2016). Verschiedene Phosphorylierungsmuster innerhalb des Rezeptor-C-Terminus‘, auch als Phosphorylierungsbarcode bezeichnet, könnten die

Arrestinkonformationen modulieren, um so verschiedene funktionale Komplexe zu generieren. Es wurde vorgeschlagen, dass diese unterschiedlichen, vom Zusammenwirken von Rezeptorkinase und Phosphatase erzeugten Muster verschiedene  $\beta$ -Arrestinkonformationen induzieren, welche spezifische Funktionen, wie z.B. Internalisierung, Desensitivierung und nachgeschaltete Signalwege, induzieren könnten (Nobles et al., 2011; Yang et al., 2015).

Die genauen Mechanismen der Arrestinaktivierung und vor allem welche Phosphorylierungsmuster des Rezeptors welche Konformationsänderung innerhalb des Arrestins bewirken, sind noch nicht geklärt. Allerdings wurde kürzlich ein konserviertes Strukturmotiv identifiziert, welches die Mobilität der Finger-Schleife des Arrestins im inaktiven Zustand beschränkt und möglicherweise über Rezeptorphosphorylierung reguliert wird (Sente et al., 2018). Distale und proximale Phosphorylierungsstellen könnten in diesem Zusammenhang selektiv mit verschiedenen strukturellen Arrestinmotiven interagieren und dabei verschiedene Arrestinkonformationen induzieren. So könnten ebendiese verschiedenen Phosphorylierungsmuster im Rezeptor-C-Terminus die Konformation von Finger-Schleife und anderen phosphorylierungssensitiven Strukturelementen des Arrestin beeinflussen und so dazu führen, dass Arrestin unterschiedliche Funktionen ausübt (Sente et al., 2018). Basales Arrestin wird über konservierte Struktur motive (3-Element-Interaktion, polarer Kern sowie einer geschlossenen Finger-Schleife) inaktiv gehalten, welche sich über die komplette Arrestinoberfläche verteilen und von unterschiedlichen phosphorylierten Stellen im Rezeptor-C-Terminus gestört werden können. Ist der Rezeptor-C-Terminus bspw. nur an distalen Positionen phosphoryliert, welche die 3-Element-Interaktion und den polaren Kern aufbricht, wäre Arrestin in der Lage, den Rezeptor-C-Terminus zu binden, Internalisierungen und G-Protein-unabhängige Signalwege zu vermitteln. Weil jedoch die Finger-Schleife in dieser Phosphorylierungskonstellation noch in der „geschlossenen“ Konformation ist, wäre Arrestin jedoch nicht in der Lage einen Rezeptor-Arrestin-Komplex mit hoher Affinität zu bilden, sodass gleichzeitig die G-Protein-vermittelte Signalkaskade nicht vollständig gehemmt wäre (Sente et al., 2018). Obwohl der bovine Rezeptor-C-Terminus sieben potenzielle Phosphorylierungsstellen aufweist, sind nur zwei Phosphate nötig, um eine hochaffine Interaktion mit Arrestin zu induzieren, und drei Phosphate, um das Arrestin komplett zu aktivieren, sodass vermutet

wird, dass Arrestin den Rhodopsinsignalweg bereits ab dem dritten von der RK angefügten Phosphat blockiert. Höhere Phosphorylierungsniveaus erhöhen die Stabilität des Arrestin-Komplexes mit lichtaktiviertem Rhodopsin nur marginal, jedoch verstärken sie die lichtunabhängige Arrestinbindung an pRho und pOps (Vishnivetskiy et al., 2007). Aus elektrophysiologischen Messungen an Stäbchen mit verschiedenen C-terminalen Rhodopsinmutanten wurde geschlossen, dass eine Serinphosphorylierung nur eine schwache Arrestinbindung bewirkt, wohingegen Threoninreste zwar langsamer phosphoryliert werden, jedoch für eine schnelle Arrestinbindung notwendig sind, sodass eine genaue Kontrolle der Desensitivierung der Photorezeptorzelle ermöglicht werden könnte (Azevedo et al., 2015). Molekulardynamische Simulationen zeigten zudem, dass der Rezeptorkern im Transmembranbereich und sein C-Terminus unabhängig voneinander die Arrestinaktivierung stimulieren können, sodass es möglich wäre, dass unterschiedliche Rezeptorbindungsmodi Arrestin in unterschiedlicher Art und Weise aktivieren können (Latorraca et al., 2018).

### **1.2.3 Stöchiometrie der Arrestin-Rhodopsin-Bindung**

Nachdem entdeckt wurde, dass Arrestin eine zentrale Rolle in der Unterbrechung des Rhodopsin-Signalweges spielt (Wilden et al., 1986), konnte gezeigt werden, dass Arrestin den aktivierten, phosphorylierten Rezeptor (pR\*) im 1 : 1 Verhältnis bindet (Schleicher et al., 1989; Pulvermüller et al., 1997). Die 1 : 1 Stöchiometrie ist im Einklang mit dem physiologischen Arbeitsbereich der Stäbchenzellen, die bereits bei wenigen R\* pro Diskmembran gesättigt sind (siehe auch 3.3.2 ab Seite 85). Auch in isolierten Nanodisks bindet Arrestin monomerisch lichtaktiviertes pRho (Tsukamoto et al., 2010; Bayburt et al., 2011). Die Kristallstruktur des Ops\*-Arr-1-Fusionskomplexes zeigt ebenfalls, dass ein Arrestinmolekül einen Rezeptor bindet (Kang et al., 2015). Aufgrund der Struktur und der Größe des Arrestins könnte es dennoch möglich sein, dass auch zwei Rezeptormoleküle gebunden werden. Eine 2 : 1 Stöchiometrie (Rho : Arr) wurde zunächst durch Modellierungen vorgeschlagen (Liang et al., 2003; Modzelewska et al., 2006). Biochemische Studien konnten später zeigen, dass Arrestin lichtaktiviertes pRho tatsächlich in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen in nativen Diskmembranen der Stäbchenzellen

binden kann. So sind z.B. abhängig von der prozentualen Verteilung des aktivierten Rezeptors unterschiedliche Bindungsstöchiometrien möglich (1 : 1 sowie 2 : 1 (pRho : Arr)) (Sommer et al., 2011; 2012). Nach diesem Modell würde die Finger-Schleife innerhalb der N-Domäne spezifisch mit lichtaktiviertem pRho interagieren (Sommer et al., 2012), sodass Phosphosensoren innerhalb der N-Domäne den phosphorylierten Rezeptor-C-Terminus binden (Sommer et al., 2014). Die flexiblere 344-Schleife der C-Domäne von Arrestin könnte weniger spezifisch entweder mit der Membranoberfläche (im Falle einer 1 : 1 Bindung) oder mit einem benachbarten Rezeptor (im Falle einer 2 : 1 Bindung) interagieren. Für letztere wäre die Phosphorylierung des zweiten Rezeptors, der von der C-Domäne gebunden wird, nicht unbedingt notwendig (Sommer et al., 2012). Ebendiese unterschiedlichen Bindungsmodi könnten dafür sorgen, dass Arrestin den Signalweg bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen effizient blockieren kann. So würde Arrestin bei niedrigem Lichteinfluss nur ein pRho-Molekül binden, um die Signaltransduktion zu inhibieren, wohingegen es bei hoher Lichtintensität auch den benachbarten Rezeptor mit inhibieren kann, eventuell sogar schon bevor dieser phosphoryliert wurde. Dies würde die Effizienz von Arrestin erhöhen und sogar die Energie für die zusätzliche Phosphorylierung einsparen (Sommer et al., 2014). Die Interaktion von Arrestin mit dem phosphorylierten Opsin (pOps) ist funktionell sehr wichtig, um die Restaktivität des Opsins zu inhibieren. Freies all-*trans*-Retinal ist, wenn es akkumuliert, toxisch für die Zelle, da durch die reaktive Aldehydgruppe leicht toxische Kondensationsprodukte mit Phospholipiden entstehen (Rozanowska & Sarna, 2005; Maeda et al., 2009; Sparrow et al., 2010). Möglicherweise könnte sich die Stimulation der Aufnahme des all-*trans*-Retinals in den Opsinpool in sehr hellen Lichtverhältnissen schützend auf die Stäbchenzelle auswirken (Sommer et al., 2015). In der phosphorylierten Form ist Opsin immer noch an Arrestin gebunden und man nimmt an, dass die Regeneration des Rezeptors mit 11-*cis*-Retinal für eine vollständige Dissoziation des Arrestins nötig ist (Lee et al., 2010; Sommer et al., 2012; Zhuang et al., 2013).

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

Bovines Rhodopsin weist C-terminal sieben potenzielle Phosphorylierungsstellen auf (siehe 1.1.7 ab Seite 17). Bisher konnte gezeigt werden, dass für die Bindung von Arrestin an den lichtaktivierten und phosphorylierten Rezeptor (pRho) in Lipidmembranen zwei Phosphorylierungen nötig sind und dass mit drei Phosphaten Arrestin quantitativ aktiviert wird. Höhere Phosphorylierungsniveaus erhöhen die Stabilität des pRho-Arr-Komplexes jedoch nur sehr geringfügig (Vishnivetskiy et al., 2007). Bisher ungeklärt ist, wieso *in vivo* bei höheren Lichtintensitäten viel höhere Phosphorylierungsniveaus gefunden werden (zum Teil Phosphorylierung aller C-terminalen Ser- und Thr-Reste; Lee et al., 2010). Zudem wurde über viele Jahre kontrovers diskutiert, welche Stöchiometrie die Bindung von Arrestin an lichtaktiviertes pRho hat und welche Faktoren die Stöchiometrie beeinflussen. Untersuchungen zeigen, dass die Stöchiometrie der pRho-Arr- und pOps-Arr-Komplexe variabel ist und in nativen Membranen von der Dichte des lichtaktivierten Rezeptors beeinflusst wird (Sommer et al., 2011, 2012 & 2014). Bisher unveröffentlichte Ergebnisse der Arbeitsgruppen Sommer/Heck legen nahe, dass auch die Salzkonzentration und der Phosphorylierungsgrad des Rhodopsins einen Einfluss auf die Stöchiometrie haben. Eine quantitative Analyse war aber bisher nicht möglich, da in nativen Membranen nur der durchschnittliche Phosphorylierungsgrad beeinflusst werden kann; der tatsächliche Phosphorylierungsgrad des Rhodopsins in diesen Proben ist aber sehr inhomogen und variabel. Ziel der Arbeit war daher, (i) in der Arbeitsgruppe eine Methode zur quantitativen Bestimmung der Rhodopsin-Phosphorylierung zu etablieren, (ii) unterschiedlich phosphorylierte Rhodopsin-Spezies zu isolieren und (iii) mit den isolierten pRho-Spezies die Bindungsstöchiometrie der resultierenden pRho-Arr-Komplexe zu quantifizieren.

Da die Trennung unterschiedlich phosphorylierten Rhodopsins nur mit Detergens-solubilisierten Proben möglich ist, sollten zudem Methoden entwickelt werden, die eine Quantifizierung der Arrestinbindung an solubilisiertes, lichtaktiviertes pRho erlauben. Des Weiteren sollten die bisher wenig untersuchten hochphosphorylierten Rhodopsin-Spezies (fünf bis sieben Phosphate) charakterisiert werden. Um ausreichende Mengen hochphosphorylierten Rhodopsins zu isolieren, sollten daher im Rahmen der Arbeit die bestehenden *in vitro* Phosphorylierungsmethoden optimiert werden.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Gewinnung und Aufreinigung von phosphoryliertem Rhodopsin

Die dieser Arbeit zugrundeliegenden Resultate wurden mit bovinen Rhodopsinproben erzielt, welche zuvor aus Retinae von geschlachteten Kühen aufgereinigt wurden. Für die Rhodopsingewinnung wurden zunächst die Außensegmente (ROS) aus der Retina isoliert. Die Phosphorylierung des Rhodopsins in Diskmembranen erfolgte durch die endogene Rhodopsinkinase, welche sich in den ROS befindet (Sommer et al., 2011).

#### 2.1.1 Charakterisierung der Phosphorylierung in Diskmembranen

Zur funktionellen Charakterisierung der Phosphorylierung innerhalb der Diskmembranen wurde bisher u.a. die Extra Meta II-Messung genutzt. Über diese lässt sich anhand einer Meta II-Stabilisierung der prozentuale Anteil nicht bzw. gering phosphorylierter Rezeptoren ermitteln, die kein Arrestin<sup>3)</sup> binden. Verglichen wurde dies mit der quantitativen Bindung des hochaffinen C-terminalen Peptidanalogs der  $\alpha$ -Transducin-Untereinheit (G<sub>T</sub>-HAA-Peptid, ILENLKDCGLF). Verschiedene Messungen mit Präparationen von phosphorylierten ROS in Diskmembranen sind in Abbildung 13 dargestellt und zeigen, wie unterschiedlich die Phosphorylierung, gemessen an der Fähigkeit des Rhodopsins, Arrestin zu binden (prozentual), nach verschiedenen und gleichen Belichtungszeiträumen während des Phosphorylierungsprozesses diverser Präparationen ist.

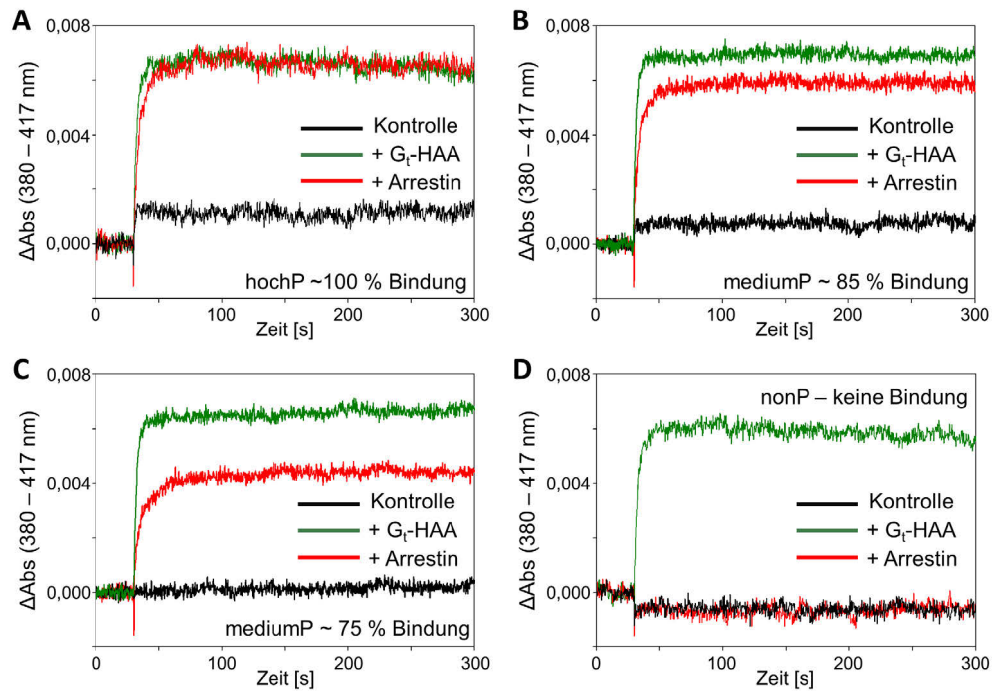
Abbildung 13 zeigt, dass nach zwei Stunden Belichtung während des Phosphorylierungsprozesses der prozentuale Anteil der Bindung von Arrestin des Rhodopsins in Diskmembranen zwischen 100 % (hochphosphorylierte Membranen, hochP) und 85 % (mediumphosphorylierte Membranen, medP) schwankte. Auch andere Präparationen mit gleicher Belichtungszeit zeigten vergleichbare Schwankungen (nicht dargestellt), sodass es möglich ist, dass die endogene Rhodopsinkinase je nach Präparation und Ausgangsmaterial trotz gleicher Bedingungen nicht immer 100 % des Rhodopsins phosphoryliert. Um die

---

<sup>3)</sup> Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit wurde durchgängig im Text und in den Abbildungen die verkürzte Benennung „Arrestin“ oder die Abkürzung „Arr“ gewählt; gleichwohl beziehen sich sämtliche Angaben auf Arrestin-1.



Zuverlässigkeit der Methode zu überprüfen, wurde eine Proteolyse mit Endopeptidase Asp-N durchgeführt, bei der C-terminal trunkiertes Rhodopsin ( $^{329}\text{Gly-Rho}$ ) entsteht, das keine Phosphorylierung mehr aufweist (vgl. Abbildung 9 auf Seite 19, Palczewski et al., 1991).

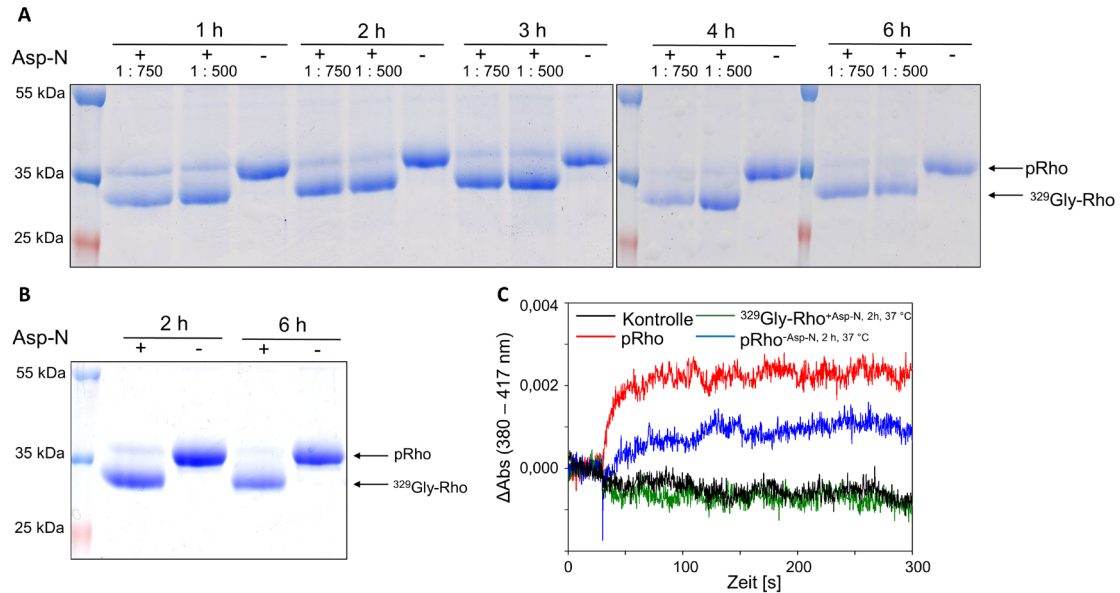


**Abbildung 13: Extra Meta II-Messungen mit unterschiedlich phosphorylierten Diskmembranen**

Diskmembranen mit 10  $\mu\text{M}$  pRhodopsin wurden zur Extra Meta II-Messung bei  $t = 30$  s mit einem Blitz in Anwesenheit des  $\text{G}_i\text{-HAA}$ -Peptids (350  $\mu\text{M}$ , grün), Arrestin (10,5  $\mu\text{M}$ , rot) oder in Abwesenheit der Bindungspartner (Kontrolle, schwarz) photoaktiviert ( $\text{pH} = 8$ ,  $0^\circ\text{C}$ ). Dargestellt sind repräsentative Diskmembranen, die zuvor bei der Phosphorylierung durch die endogene Rhodopsinkinase für 2 h (A, B), 10 min (C) oder gar nicht (D) belichtet wurden. Die jeweils berechnete prozentuale Arrestinbindung ist in Boxen dargestellt und die Phosphorylierung der Membranen wie folgt charakterisiert: 100 % Arr-Bindung = hochphosphoryliert (hochP); 75 % bis 85 % Arr-Bindung = mediumphosphoryliert (mediumP); 0 % Arr-Bindung = unphosphoryliert (nonP).

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Proteolyse von phosphoryliertem Rhodopsin (pRho) in Diskmembranen mit Asp-N. Nach Bestimmung der geeigneten Verdaubedingungen (vgl. Abbildung 14 A & B, 2 h,  $37^\circ\text{C}$ , Asp-N Einsatz: 1:750) wurde eine Extra Meta II-Messung in Puffer H durchgeführt, um die Arrestinbindung zu untersuchen. Nach der Proteolyse bleibt das Signal (blau) auf Höhe der Negativkontrolle (schwarz), sodass

man davon ausgehen kann, dass diese erfolgreich war und durch das Fehlen des phosphorylierten C-Terminus‘ des Rhodopsins kein Arrestin mehr gebunden werden.



**Abbildung 14: Optimierung der C-terminalen Proteolyse von Rhodopsin mit Asp-N**

(A) Analyse der Asp-N Proteolysebedingungen: 5  $\mu$ M Diskmembranen wurden mit Asp-N (1 : 500 bzw. 1 : 750) sowie ohne Asp-N (–) in 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5, versetzt und bei 37 °C unter leichtem Schütteln (120 rpm) für 1 h bis 6 h inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Proben (Auftrag:  $\sim$ 8  $\mu$ g) in einem SDS-Gel aufgetrennt. (B) Wiederholung des Asp-N Verdau (1 : 750). (C) Extra Meta II-Messung der Bindung von Arrestin: Phosphorylierte sowie mit Asp-N inkubierte (2 h, 37 °C, Asp-N Einsatz: 1 : 750) Diskmembranen (5  $\mu$ M) wurden bei t = 30 s mit einem Blitz in Anwesenheit von Arrestin (10,5  $\mu$ M) photoaktiviert (pH = 8, 0 °C). Die Kontrolle (schwarz) wurde in Abwesenheit der Bindungspartner aufgenommen. Die rote Spur zeigt phosphoryliertes Rhodopsin in Diskmembranen mit Arrestin. Nach Asp-N Verdau (grün) bzw. ohne Asp-N-Zusatz, aber bei gleicher Inkubation (blau).

Zu beachten ist allerdings, dass die reine Inkubation bei 37 °C für zwei Stunden auch ohne Asp-N-Zugabe bereits dazu führte, dass das Extra Meta II-Signal im Vergleich zur Kontrolle ohne Inkubation mit phosphorylierten Diskmembranen und Arrestin sinkt. Dennoch konnte mit diesem Versuch ein generelles Vorhandensein der Phosphorylierung der Membranen vor der Proteolyse gezeigt werden. Allerdings handelt es sich hierbei nur um ein qualitatives Maß des Phosphorylierungsgrades, weswegen es notwendig war, zusätzlich eine quantitative Methode zu etablieren.

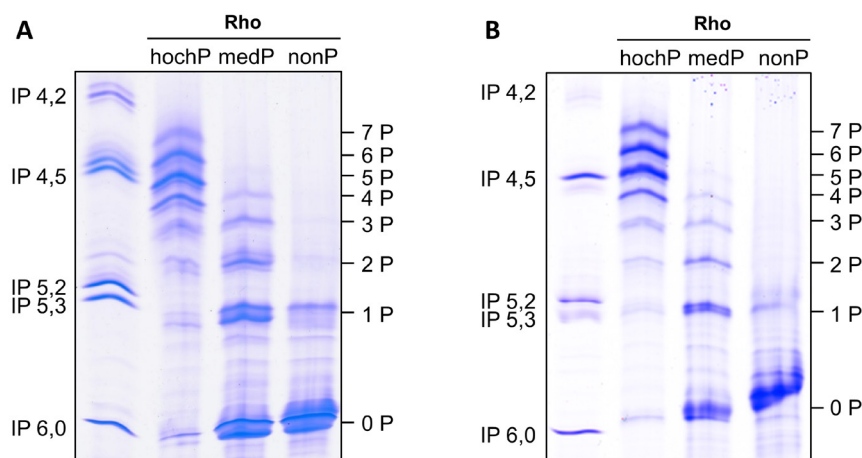
## 2.2 Etablierung einer Methode zur Analyse der Rhodopsinphosphorylierung

### 2.2.1 Trennung von phosphoryliertem Rhodopsin via IEF

Für die Trennung des phosphorylierten Rhodopsins (nicht lichtaktiviert) über die isoelektrische Fokussierung (IEF) war es zwingend nötig, die Rhodopsinproben zuvor zu delipidieren, da die negativ geladenen Phospholipide der Membranen die IEF stören (vgl. Abbildung 45 A auf Seite 147). Phosphoryliertes, regeneriertes Rhodopsin in Diskmembranen wurde abgewandelt nach Wilden und Kühn durch Affinitätschromatographie über Concanavalin A (ConA) gereinigt (1982) (vgl. Abbildung 41 auf Seite 117). Zum Waschen und Delipidieren wurden die Detergenzien OG (1 %) sowie DDM (0,05 %) genutzt. Bei der Elution wurde darauf geachtet, nur Eluate weiterzuverwenden, deren  $A_{280\text{ nm}}/A_{500\text{ nm}}$ -Verhältnis zwischen 1,6 und 2,0 lag, um eine gleichbleibend hohe Reinheit der Proben zu gewährleisten (Plantner & Kean, 1976). Bis zu 80 % des eingesetzten phosphorylierten Rhodopsins konnte eluiert werden. Das dabei sehr geringe Ablösen des ConAs von der Agarose wurde bereits zuvor gezeigt (De Grip et al., 1982) und störte bei weiteren Experimenten nicht. Zur Kontrolle der Aufreinigung über ConA wurde im Anschluss eine SDS-PAGE durchgeführt, welche ebenfalls die Reinheit der gereinigten Probe bestätigte (Abbildung 41 auf Seite 117).

Im Nachfolgenden wird das Partizip „gereinigt“ verwendet, um Rhodopsin zu beschreiben, welches solubilisiert und über ConA-Affinitätschromatographie isoliert und delipidiert wurde. Für die Auftrennung von phosphoryliertem, gereinigtem Rhodopsin wurden SERVLYT™ Trägerampholyte 3-7 verwendet, um einen pH-Bereich von 3 bis 7 abzudecken. Die isoelektrische Fokussierung von verschieden lange phosphorylierten Diskmembran-Präparationen (vgl. 2.1.1 ab Seite 34) zeigt deutliche Unterschiede in der Bandenverteilung (siehe Abbildung 15). Die Präparationen unterschieden sich in ihrer Phosphorylierungszeit durch die endogene Rhodopsinkinase. Die einzeln aufgetrennten Rhodopsin-Spezies wurden der unterschiedlichen Phosphorylierungsanzahl anhand ihres sinkenden isoelektrischen Punkts (IP) und der Tatsache, dass bis zu sieben Phosphorylierungsstellen zusätzlich zum unphosphorylierten Ausgangsmolekül möglich sind, zugeordnet (siehe 2.2.2 ab Seite 39). Die Phosphorylierungsanzahl schwankte von null bis

sieben Phosphatresten innerhalb des C-Terminus‘ des bovinen Rhodopsins. So hatte unphosphoryliertes Rhodopsin (nonP), welches während seiner Präparation komplett unbelichtet blieb, seine höchste Konzentration bei einem IP von 6,0. Schwache Banden traten außerdem bei etwa IP 5,3 auf, was vermutlich einem ersten Phosphatrest entspräche. Ebenfalls kann daraus geschlossen werden, dass die ursprünglich als unphosphoryliert (nonP) benannte Rhodopsin-Präparation nicht einheitlich unphosphoryliert vorlag, was darauf zurückzuführen ist, dass das native Ausgangsmaterial nicht vollständig dunkeladaptiert war und daher bereits bis zu zweifach phosphoryliert vorlag.



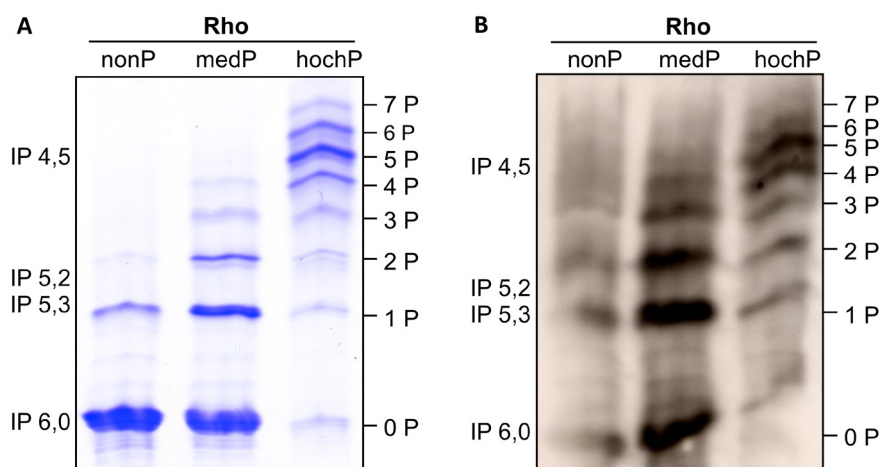
**Abbildung 15: IEF-Trennung verschieden phosphorylierter Rhodopsin-Präparationen**

(A, B) IEF-Gele von verschieden phosphorylierten Rhodopsin-Präparationen nach ConA-Aufreinigung. Die Phosphorylierungsanzahl ist seitlich markiert (0 P bis 7 P). Hochphosphoryliertes (hochP) Rhodopsin wurde 2 h für die Phosphorylierung durch die endogene Rhodopsinkinase belichtet, mediumphosphoryliertes (medP) Rhodopsin dagegen nur 10 min und unphosphoryliertes (nonP) Rhodopsin blieb unbelichtet. Dargestellt sind die Ergebnisse aus zwei unabhängigen Präparationen (A, B).

Die mediumphosphorylierte (medP) Rhodopsin-Präparation wurde während der Phosphorylierungsreaktion zehn Minuten belichtet. In diesen zehn Minuten konnte durch die endogene Rhodopsinkinase eine Mischung aus 0 P bis 4 P, in geringem Ausmaß fünffach phosphoryliertem Rhodopsin katalysiert werden und unterscheidet sich damit deutlich von der hochphosphorylierten (hochP) Rhodopsin-Präparation, die zwei Stunden belichtet wurde. Die 12-mal längere Inkubation führte dazu, dass nun die höher phosphorylierten Rhodopsinproben (4 P bis 7 P) viel höher konzentriert vorlagen als die niedriger phosphorylierten (0 P bis 3 P).

### 2.2.2 Identifizierung der IEF-Banden

Bei der Auftrennung durch IEF schloss sich die Frage an, ob alle der erhaltenen Banden im Bereich des IPs von 6,0 bis 4,0 tatsächlich Rhodopsin abbilden. Um dies zu überprüfen, wurde ein Western-Blot durchgeführt. Der monoklonale, murine Primärantikörper  $\alpha$ 1D4 bindet das C-terminale Rhodopsin-epitop TETSQVAPA-(COOH) und kann somit zeigen, ob die bei der IEF aufgetretenen Banden tatsächlich auf unterschiedliche Rhodopsin-Spezies zurückzuführen sind (siehe Abbildung 16).



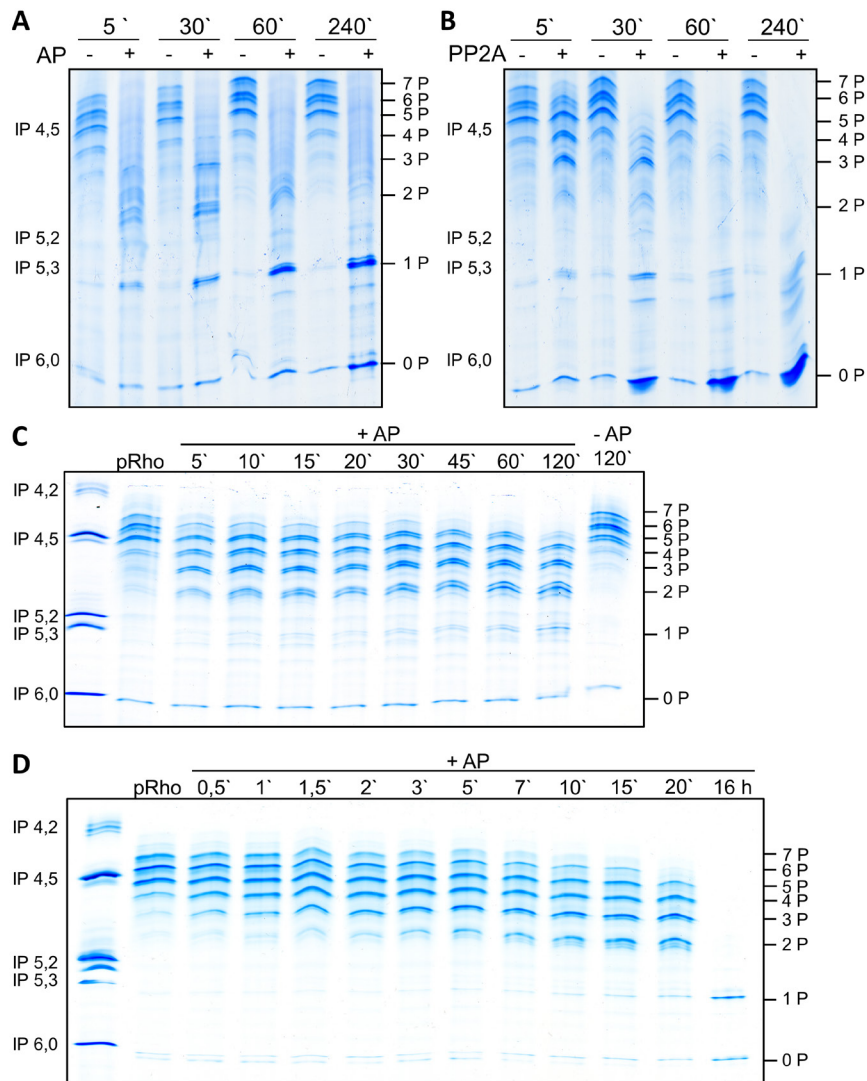
**Abbildung 16: Western-Blot nach IEF**

IEF-Gel (A) und Western-Blot (B) von verschiedenen phosphorylierten Rhodopsin-Präparationen (2 h, 10 min, 0 min belichtet bei Phosphorylierung für hochP, medP sowie nonP) nach ConA-Aufreinigung. Der Primärantikörper ( $\alpha$ 1D4) ist gegen den C-Terminus von Rhodopsin gerichtet.

Das Ergebnis des Western-Blots zeigt, dass alle im IEF-Gel auftretenden Banden Rhodopsin enthalten. Interessanterweise ist die Bindung des Primärantikörpers, welcher spezifisch für den C-Terminus des Rhodopsins ist, nicht signifikant von den verschiedenen Phosphatresten gestört. Die Aufspaltung der Banden im Western-Blot deckt sich mit der Bandenverteilung im IEF-Gel. So konnten in der hochphosphorylierten Rhodopsinprobe auch mittels Western-Blot bis zu acht verschiedene Banden identifiziert werden, die den verschiedenen Phosphorylierungsgraden (0 P bis 7 P) entsprechen könnten. Dennoch fehlt in dieser Darstellung weiterhin der Beweis, dass das Bandenmuster auch wirklich der Anzahl der jeweiligen Phosphate im C-Terminus des Rhodopsins entspricht.

Um dies zu zeigen, wurde eine Dephosphorylierung der zuvor phosphorylierten Rhodopsinproben mit anschließender isoelektrischer Auftrennung durchgeführt. Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse der Dephosphorylierungsversuche von phosphoryliertem Rhodopsin mit der Alkalischen Phosphatase (AP) und der katalytisch aktiven  $\gamma$ -Untereinheit der Proteinphosphatase 2A, die in den ROS das phosphorylierte Rhodopsin wieder dephosphoryliert. Abbildung 17 A und Abbildung 17 B zeigen, dass sich das Bandenmuster der isoelektrischen Auftrennung mit fortschreitender Inkubationszeit der jeweiligen Phosphatase ändert.

In Abbildung 17 A wurde bspw. eine sehr hohe Menge an AP hinzugefügt, sodass bereits nach 5-minütiger Inkubation sämtliche Banden für 4 P bis 7 P verschwunden sind. Mit dem Einsatz von 0,4 U bis 0,7 U AP konnte eine stufenweise Abnahme der Phosphorylierung anhand der allmählich verschwindenden IEF-Gelbanden gezeigt werden (Abbildung 17 C und D). So wird deutlich, dass bereits nach fünf Minuten die obere Bande verschwindet, welche siebenfach phosphoryliertes Rhodopsin darstellt, wohingegen die niedrigeren Phosphatanzahlen (0 P bis 4 P) zunehmen. Nach etwa 20 Minuten (D) bzw. 45 Minuten (C) liegt das Rhodopsin nur noch maximal fünffach phosphoryliert vor, bis es nach 16-stündiger AP-Einwirkzeit nur noch null- bis einfach phosphoryliert ist. Diese Versuche bestätigen, dass die im IEF-Gel aufgetrennten Banden den unterschiedlichen Phosphorylierungsstufen zugeordnet werden können.



**Abbildung 17: Dephosphorylierung von pRho**

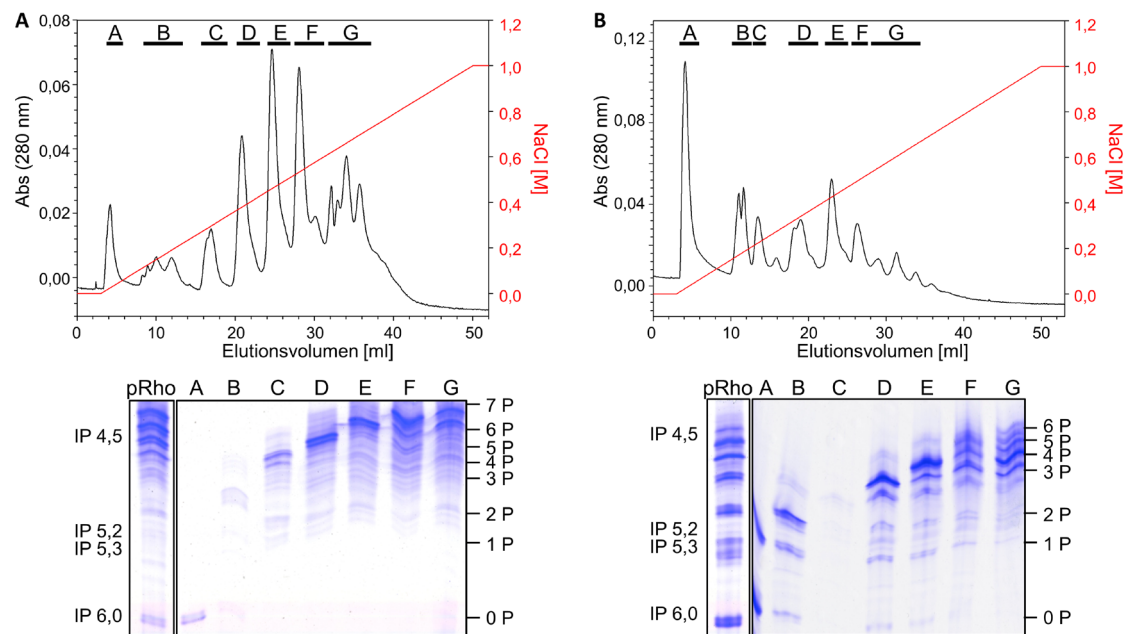
(A bis D) Isoelektrische Auftrennung nach Dephosphorylierung von pRho für verschiedene Inkubationszeiten (bei 30 °C) zur Bestimmung geeigneter Bedingungen für die Dephosphorylierung. (A, B, D) Dephosphorylierung von pRho mittels Alkalischer Phosphatase (AP) mit 20 U (A), 0,7 U (C) und 0,4 U (D). (B) Dephosphorylierung von pRho mittels 2,7 mU Proteinphosphatase 2A  $\gamma$ -Untereinheit (PP2A). Die einzelnen Banden sind der jeweiligen Anzahl der Phosphate (P) zugeordnet (rechts).

## 2.3 Separation von pRho-Spezies

Mit der IEF ist es möglich, die Phosphorylierungsunterschiede und Verteilung der Phosphorylierungsgrade innerhalb der Rhodopsin-Präparationen zu visualisieren. Die einer IEF entsprechenden präparative Methode ist die Chromatofokussierung (Slyterman &



Wijdenes, 1977, 1978 & 1981; Slyterman & Elgerson, 1978). Da der von der Firma Pharmacia für die Ausbildung des pH-Gradienten entwickelte Puffer (Polypuffer 74) zu Beginn der vorliegenden Arbeit aus der Produktion genommen wurde, konnte die Trennung der unterschiedlich phosphorylierten Rhodopsin-Spezies (pRho-Spezies) nicht mehr nach dem in der Literatur beschriebenen Protokoll mittels Chromatofokussierung erfolgen. Mehrere alternative Puffersysteme wurden untersucht (Shan & Anderson, 2002; Andersen et al., 2004; Ahamed et al., 2007; Shen et al., 2008), brachten aber nicht den gewünschten Trennungseffekt (Daten nicht gezeigt). Deswegen musste eine alternative säulenchromatographische Trennungsmethode etabliert werden. Verwendet wurde ein abgewandeltes Protokoll von McDowell (McDowell et al., 2000), bei der die phosphorylierten Rhodopsin-Spezies mit einer ursprünglich für die Chromatofokussierung entwickelten Anionenaustauschersäule (MonoP) mittels Salzgradient (0 M bis 1 M NaCl) aufgetrennt wurden. Die einzelnen Auftrennungsläufe werden nachfolgend als RS (für Rhodopsin-Spezies-Separation) abgekürzt.



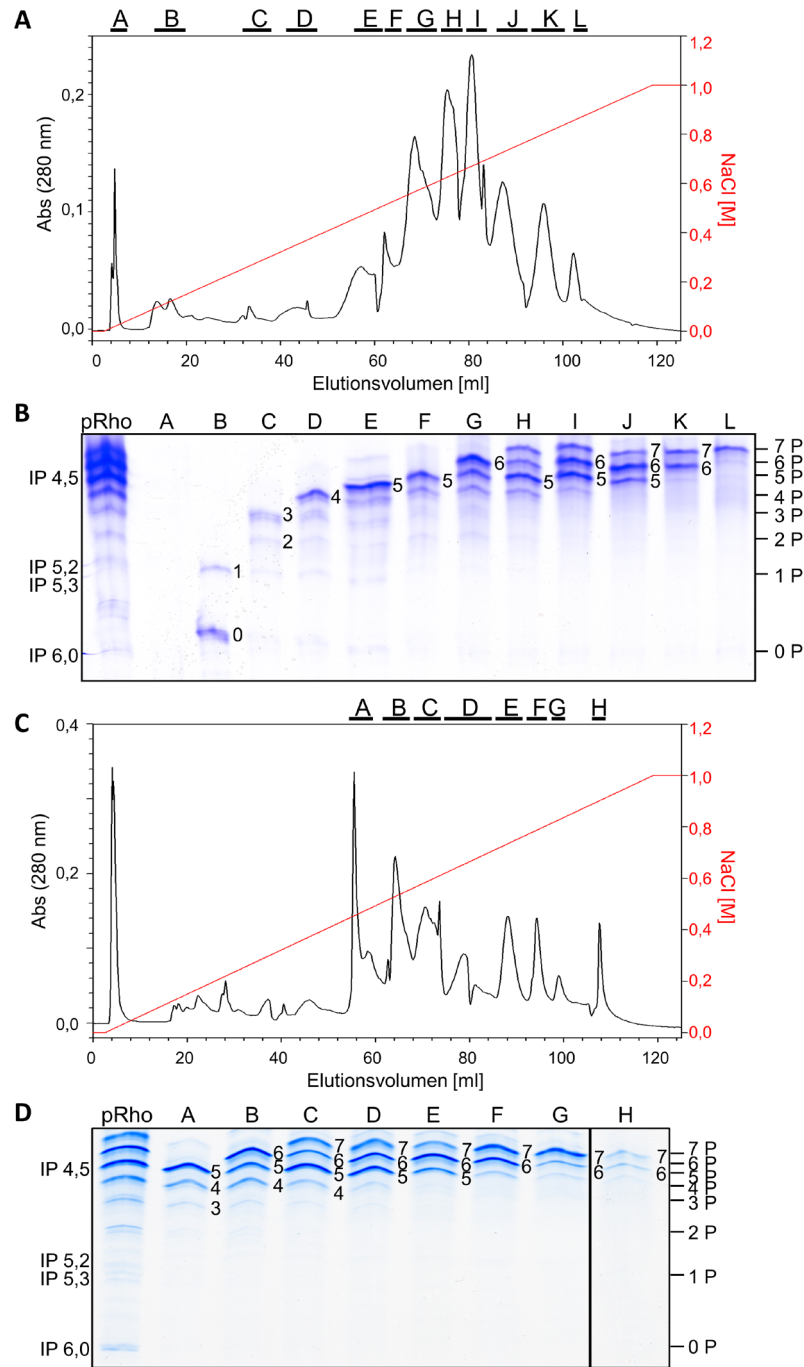
**Abbildung 18: Rhodopsin-Spezies-Separation von phosphoryliertem Rhodopsin**

Rhodopsin-Spezies-Separation (RS)-Elutionsprofile (oben) einer hochphosphorylierten (A) sowie einer mediumphosphorylierten (B) Rhodopsin-Präparation. Die entsprechenden Fraktionen (A bis G) wurden nach Aufbereitung via IEF aufgetrennt (unten). Die Anzahl der Phosphate ist rechts den Banden anhand der IPs zugeordnet (0 P bis 7 P).



Abbildung 18 zeigt den Vergleich der RS-Läufe von hoch- und mediumphosphoryliertem Rhodopsin als Ausgangsmaterial. Wie im IEF-Gel bereits festgestellt, ist die Konzentration der höheren Phosphatanzahl (4 P bis 7 P) in der Rhodopsin-Präparation am höchsten, die während der Phosphorylierung für zwei Stunden belichtet wurde. Die höher phosphorylierten Rhodopsin-Spezies eluieren ab einer Salzkonzentration von 0,4 M bis etwa 0,8 M. Im IEF-Gel kann der Phosphorylierungsgrad der in den jeweiligen Fraktionen enthaltenen Rhodopsin-Spezies ermittelt werden. So enthält die Fraktion C (aus Abbildung 18 A) überwiegend vierfach, Fraktion D fünffach, und Fraktion E sechsfach phosphoryliertes Rhodopsin. Die Fraktionen F und G beinhalten eine Mischung aus sechs- und siebenfach phosphoryliertem Rhodopsin. Verglichen damit weist das Elutionsprofil des RS-Laufes mit mediumphosphorylierter Rhodopsin-Präparation als Ausgangsmaterial ein komplett anderes Elutionsprofil auf. Auch das anschließende IEF-Gel mit den aufbereiteten Elutionsfraktionen (A bis G, aus Abbildung 18 B) zeigt ein anderes Bandenmuster. Obwohl bei der mediumphosphorylierten Rhodopsin-Präparation auch alle phosphorylierten Rhodopsin-Spezies vertreten sind (0 P bis 7 P), liegen im Vergleich zur anderen Präparation gerade die niedrig phosphorylierten Spezies (0 P bis 4 P) höher konzentriert vor. Für die Auftrennung spielt auch der pH-Wert eine entscheidende Rolle. Der Einfluss des pH-Wertes auf die Trennung ist auf Seite 148 in Abbildung 46 dargestellt. Ein höherer pH-Wert (pH = 8) führt zur Stauchung des Elutionsprofils, wohingegen ein pH-Wert unterhalb von 7 (pH = 6) ein breiteres Elutionsprofil bewirkt. Da die einzelnen Rhodopsin-Spezies bei pH = 7 am besten aufgetrennt wurden, wurden alle weiteren Rhodopsinseparationen bei pH = 7 durchgeführt.

Abbildung 19 zeigt, wie unterschiedlich die Verteilung der Rhodopsin-Spezies innerhalb verschiedener pRho-Präparationen ist, obwohl sie unter den gleichen Bedingungen (zwei Stunden Belichtung) durchgeführt wurden. Weitere Rhodopsin-Spezies-Separationsläufe sowie eine Tabelle mit den pRho-Spezies aus allen RS-Läufen sind im Anhang dargestellt (vgl. Abbildung 47 bis Abbildung 49 ab Seite 149; Tabelle 12 bis Tabelle 15 ab Seite 151). Die Nummerierung der einzelnen RS-Läufe lehnt an die ursprüngliche Versuchsanzahl an, inklusive sämtlicher Vorversuche, bis die Methode zum quantitativen Auftrennen der phosphorylierten Rhodopsin-Spezies genutzt werden konnte. RS-Läufe 17 und 19 (Abbildung 19 A & C) zeigen die je Peak vereinten Fraktionen (A bis H bzw. A bis L).



**Abbildung 19: RS-Läufe 17 & 19**

(A, C) Elutionsprofile von zwei unterschiedlichen, hochphosphorylierten Rhodopsin-Präparationen (RS-Läufe 17 (A) und 19 (C)). Fraktionen (A bis H bzw. A bis L) wurden nach Aufbereitung via IEF aufgetrennt (B, D). Die Anzahl der Phosphate ist rechts den Banden aufgrund der IPs zugeordnet (0 P bis 7 P), sowie zur Verdeutlichung direkt neben dominierenden Banden gesetzt. Es wurden insgesamt etwa 8 mg pRho aufgetrennt, um mit den phosphorylierten Rhodopsin-Spezies weiterzuarbeiten.

Obwohl der erste Peak in RS17 (Fraktion ARS17) eine deutliche UV-Absorption aufweist, ist im IEF-Gel kein Rhodopsin nachweisbar. Diese Fraktion enthält vermutlich andere Proteine wie z.B. Concanavalin A. Abhängig von den Mengen an unphosphoryliertem Rhodopsin in der Probe enthält der erste Peak auch unphosphoryliertes Rhodopsin, welches nicht an das positiv geladene MonoP-Säulenmaterial bindet (vgl. Abbildung 18 auf Seite 42 & Abbildung 48 auf Seite 149). Da die höher phosphorylierten Rhodopsinproben für weitere Bindungsanalysen eingesetzt wurden, wurden die Fraktionen mit den niedrigeren Phosphorylierungsniveaus nur stichprobenartig untersucht. Mit steigender NaCl-Konzentration steigt die Anzahl der Phosphate in den Rhodopsinproben. So konnten mit RS17 und RS19 pRho-Spezies mit bis zu sieben Phosphatresten aufgereinigt werden, welche in späteren fluoreszenzbasierten Messungen zur Bindung von Arrestin untersucht wurden. Eine Auflistung der aus den IEF-Gelen der RS-Läufe 17, 19 bis 21 und 25 ermittelten prozentualen Phosphorylierungsverteilung ist in Tabelle 1 aufgeführt. Fraktionen, die sehr ähnliche Mischungen an pRho-Spezies beinhalten, wurden für die nachfolgenden Messungen vereinigt, wenngleich leichte Unterschiede in der prozentualen Verteilung der Phosphorylierungszahlen erkennbar sind. Zur Benennung der jeweiligen Mischungen wurden die enthaltenen pRho-Spezies (ab etwa 5 % Anteil) angegeben, wobei die jeweils dominierende Spezies in fettgedruckter Zahl dargestellt ist.

**Tabelle 1:** Prozentuale Verteilung der Phosphatreste innerhalb der pRho-Spezies<sup>a</sup>

<b>3/4/<u>5</u>-P</b>								
<b>RS</b>	<b>0 P</b>	<b>1 P</b>	<b>2 P</b>	<b>3 P</b>	<b>4 P</b>	<b>5 P</b>	<b>6 P</b>	<b>7 P</b>
17 #E	-	0,8 %	1,1 %	5,4 %	17,8 %	<b>75,0 %</b>	-	-
17 #F	-	-	2,2 %	3,3 %	24,0 %	<b>70,6 %</b>	-	-
19 #A	-	-	0,3 %	1,9 %	17,8 %	<b>80,0 %</b>	-	-
20 #A	-	-	-	1,0 %	10,8 %	<b>88,2 %</b>	-	-
21 #A	0,6 %	1,3 %	1,4 %	7,9 %	24,6 %	<b>64,2 %</b>	-	-
21 #B	0,5 %	0,4 %	3,8 %	7,3 %	29,3 %	<b>58,8 %</b>	-	-
25 #A	-	0,3 %	1,0 %	6,0 %	21,3 %	<b>70,6 %</b>	0,5 %	0,3 %
25 #B	-	0,3 %	1,2 %	6,5 %	30,0 %	<b>59,3 %</b>	1,2 %	1,5 %
<b>4/5/<u>6</u>-P</b>								
<b>RS</b>	<b>0 P</b>	<b>1 P</b>	<b>2 P</b>	<b>3 P</b>	<b>4 P</b>	<b>5 P</b>	<b>6 P</b>	<b>7 P</b>
17 #G	-	-	1,6 %	3,2 %	14,3 %	29,6 %	<b>51,3 %</b>	-
19 #B	-	-	-	1,1 %	14,2 %	14,2 %	<b>53,5 %</b>	-
20 #B	-	-	-	-	7,4 %	28,1 %	<b>64,6 %</b>	-
21 #C	-	-	1,3 %	4,6 %	22,0 %	33,7 %	<b>38,4 %</b>	-
25 #C	-	-	1,1 %	5,6 %	15,4 %	32,8 %	<b>43,8</b>	1,3 %

<b>4/5/6/7-P</b>								
<b>RS</b>	<b>0 P</b>	<b>1 P</b>	<b>2 P</b>	<b>3 P</b>	<b>4 P</b>	<b>5 P</b>	<b>6 P</b>	<b>7 P</b>
17 #H	-	-	0,5 %	1,3 %	12,0 %	<b>44,4 %</b>	20,3 %	21,5 %
19 #C	-	-	-	0,4 %	4,6 %	<b>45,7 %</b>	21,3 %	28,0 %
20 #C	-	-	-	-	2,1 %	<b>63,3 %</b>	15,1 %	19,6 %
21 #D	-	-	0,5 %	2,2 %	13,1 %	<b>35,3 %</b>	27,3 %	21,6 %
25 #D	-	-	-	0,6 %	10,2 %	<b>35,2 %</b>	16,8 %	37,2 %
<b>5/6/7-P</b>								
<b>RS</b>	<b>0 P</b>	<b>1 P</b>	<b>2 P</b>	<b>3 P</b>	<b>4 P</b>	<b>5 P</b>	<b>6 P</b>	<b>7 P</b>
17 #I	-	-	-	-	6,5 %	<b>38,9 %</b>	<b>34,6 %</b>	<b>20,0 %</b>
19 #D	-	-	-	0,2 %	1,7 %	<b>36,9 %</b>	<b>33,0 %</b>	<b>28,1 %</b>
20 #D	-	-	-	-	0,7 %	<b>32,7 %</b>	<b>27,4 %</b>	<b>39,2 %</b>
21 #D	-	-	-	0,8 %	10,3 %	<b>33,9 %</b>	<b>29,8 %</b>	<b>25,2 %</b>
25 #E	-	-	-	-	0,9 %	<b>36,4 %</b>	<b>29,3 %</b>	<b>33,4 %</b>
<b>5/6/7-P</b>								
<b>RS</b>	<b>0 P</b>	<b>1 P</b>	<b>2 P</b>	<b>3 P</b>	<b>4 P</b>	<b>5 P</b>	<b>6 P</b>	<b>7 P</b>
17 #J	-	-	-	-	-	28,2 %	<b>57,4 %</b>	14,4 %
19 #E	-	-	-	-	-	24,7 %	<b>56,9 %</b>	18,3 %
20 #E	-	-	-	-	-	14,8 %	<b>73,9 %</b>	11,3 %
21 #E	-	-	-	-	-	29,9 %	<b>47,6 %</b>	17,8 %
21 #F	-	-	-	-	-	16,4 %	<b>43,3 %</b>	40,3 %
25 #F	-	-	-	-	-	27,9 %	<b>50,3 %</b>	21,8 %
<b>6/7-P</b>								
<b>RS</b>	<b>0 P</b>	<b>1 P</b>	<b>2 P</b>	<b>3 P</b>	<b>4 P</b>	<b>5 P</b>	<b>6 P</b>	<b>7 P</b>
17 #K	-	-	-	-	-	5,9 %	<b>55,8 %</b>	<b>38,2 %</b>
19 #F	-	-	-	-	-	4,3 %	<b>43,8 %</b>	<b>51,8 %</b>
20 #F	-	-	-	-	-	3,5 %	<b>47,9 %</b>	<b>48,6 %</b>
21 #G	-	-	-	-	-	12,2 %	<b>46,5 %</b>	<b>41,3 %</b>
21 #I	-	-	-	-	-	17,6 %	<b>39,6 %</b>	<b>42,8 %</b>
25 #G	-	-	-	-	-	14,7 %	<b>44,1 %</b>	<b>41,2 %</b>
<b>6/7-P</b>								
<b>RS</b>	<b>0 P</b>	<b>1 P</b>	<b>2 P</b>	<b>3 P</b>	<b>4 P</b>	<b>5 P</b>	<b>6 P</b>	<b>7 P</b>
17 #L	-	-	-	-	-	6,4 %	12,2 %	<b>81,4 %</b>
19 #G	-	-	-	-	-	2,2 %	15,4 %	<b>82,3 %</b>
19 #H	-	-	-	-	-	-	49,0 %	<b>51,0 %</b>
20 #G	-	-	-	-	-	3,8 %	35,0 %	<b>61,3 %</b>
20 #H	-	-	-	-	-	7,5 %	38,7 %	<b>53,9 %</b>
21 #H	-	-	-	-	-	11,7 %	34,5 %	<b>53,8 %</b>
25 #H <sup>b</sup>	-	-	-	-	-	2 %	25 %	<b>73 %</b>
<sup>a</sup> mit der Software „GelQuant“ unter Verwendung der dargestellten IEF-Gele zu den jeweiligen RS-Läufen bestimmt (siehe auch Abbildung 19 auf Seite 44, Abbildung 47 bis Abbildung 49 ab Seite 149).								
<sup>b</sup> Das IEF-Gel zeigt keine klare Bande, weshalb die prozentuale Verteilung nur eine Schätzung darstellt.								

## 2.4 Fluoreszenzbasierte Untersuchungen zur Rezeptorbindung von Arrestin

Fluorophore, welche an Arrestin an spezifischen Stellen gekoppelt werden, können genutzt werden, um eine Arrestinbindung an sowie -dissoziation vom Rezeptor zu ermitteln (Sommer et al., 2005 & 2006). Kombiniert man dies mit einer Titrationsanalyse, so kann aufgrund der rezeptorinduzierten Fluoreszenzänderungen der jeweiligen fluorophormarkierten Arrestinmutante auf die Arrestin-Rezeptor-Bindungsstöchiometrie geschlossen werden (Sommer et al., 2011, 2012 & 2015).

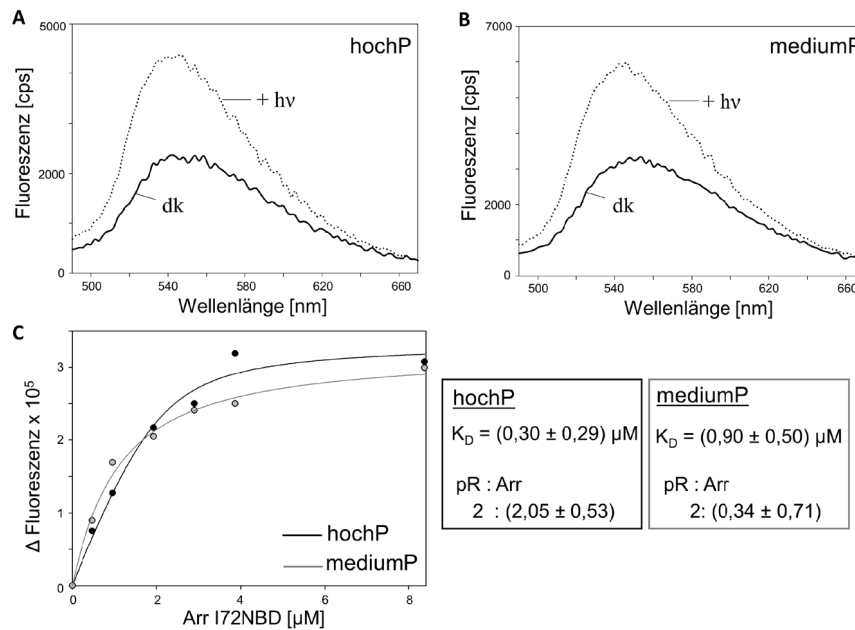
Für sämtliche fluoreszenzbasierte Untersuchungen wurde ein Arrestinkonstrukt genutzt, dem alle nativen Cystein- und Tryptophanreste fehlen (C63A, C128S, C143A, W194F). Für die Experimente wurden verschiedene Arrestinmutanten verwendet (I72B, I299B/L173W, S344NBD; siehe dafür auch Tabelle 6 auf Seite 84), welche funktionell bereits gut charakterisiert wurden und im Wesentlichen äquivalent zum Wildtypprotein sind (Sommer et al., 2011). Sie wurden ausgewählt, um unterschiedliche bei der Rezeptorbindung involvierten Bereiche innerhalb des Arrestins abzudecken (genaue Erläuterungen dazu siehe 3.3 ab Seite 84).

### 2.4.1 Fluoreszenzbasierte Titrations mit Rhodopsin in Diskmembranen

Zur Überprüfung, inwiefern der Grad der Phosphorylierung einen Einfluss auf die Arrestinbindung hat, wurden zunächst fluoreszenzbasierte Arrestintitrations (als ortsspezifische Fluoreszenzexperimente (*site-directed fluorescence experiments*)) mit Rhodopsin in Diskmembranen durchgeführt. Hierfür wurden je 2  $\mu\text{M}$  phosphoryliertes Rhodopsin in Diskmembranen (hochP: 100 % Arrestinbindung; mediumP: 75 % Arrestinbindung; vgl. 2.1.1 ab Seite 34) von 0  $\mu\text{M}$  bis 8  $\mu\text{M}$  Arr I72NBD titriert. Die Ergebnisse hierfür sind in Abbildung 20 dargestellt.<sup>4)</sup> Die ortsspezifischen Fluoreszenzdaten zeigen, dass

<sup>4)</sup> Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit wurde in Abschnitt 2 „Ergebnisse“ durchgängig in den Angaben zur berechneten Stöchiometrie und den Komplexen in Text, Tabellen und in den Abbildungen die verkürzte Benennung „phosphoryliertes Rhodopsin“ oder die Abkürzung „pRho“ gewählt; gleichwohl beziehen sich sämtliche Angaben auf lichtaktiviertes, phosphoryliertes Rhodopsin.

hochP-Rhodopsin aus den Diskmembranen das Arrestin I72NBD etwa 1 : 1 bindet, wohingegen die Bindungsstöchiometrie des mediumP-Rhodopsins aus Diskmembranen bei etwa 2 : 1 (pRho : Arr) liegt.



**Abbildung 20: Arr I72NBD-Titration mit pRho in Diskmembranen**

(A-C) Die Bindung von Arrestin I72NBD an pRho in Diskmembranen kann über einen Fluoreszenzanstieg quantifiziert werden. Arr I72NBD wurde gegen 2  $\mu$ M pRho in Puffer F mit unterschiedlicher Phosphorylierung (hochP und mediumP) titriert (Anregung bei 360 nm). Die Fluoreszenz wurde im Dunkeln (dk; durchgängige Kurve) und nach voller Photoaktivierung des Rezeptors (hv; gestrichelte Kurve) gemessen. (A, B) Exemplarische Emissionsspektren (1  $\mu$ M Arr I72NBD) mit hochP (A) und mediumP (B). (C) Änderung der Fluoreszenz ( $\Delta$ Fluoreszenz) als Funktion der Arr I72NBD-Konzentration (schwarz: hochP-Rho; grau: mediumP-Rho).  $\Delta$ Fluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten, integrierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und des Licht-Spektrums. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität ( $K_D$ ) und die Bindungsstöchiometrie; die Werte sind in den Boxen angegeben.

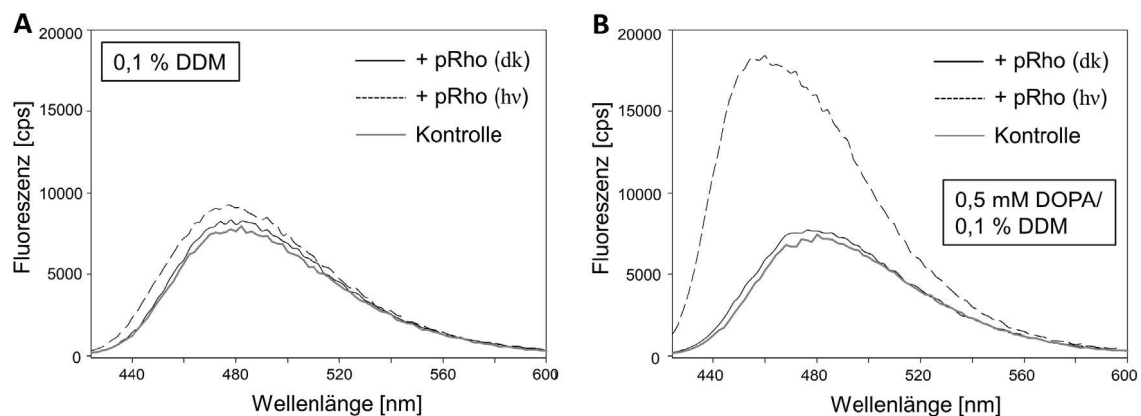
## 2.4.2 Fluoreszenzbasierte Titrations mit gereinigtem pRho

Für die effektive Bindung von Arrestin an phosphoryliertes Rhodopsin ist die Anwesenheit negativ geladener Lipide zwingend notwendig (Sommer et al., 2006; Sommer & Far-

rens, 2006). Im Fall der solubilisierten, über ConA-gereinigten und über MonoP-separierten Rhodopsinproben verschiedener Phosphorylierungsniveaus mussten die fehlenden negativ geladenen Phospholipide für die Bindungsuntersuchungen nachträglich hinzugegeben werden. Um optimale Bindungsergebnisse zu erzielen, wurden zunächst verschiedene negativ geladene Lipide charakterisiert.

#### 2.4.2.1 Einfluss von DOPA

Für die gemischte Mizellenbildung wurde das negativ geladene Phospholipid 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphat (DOPA, siehe Abbildung 42 auf Seite 124) verwendet.



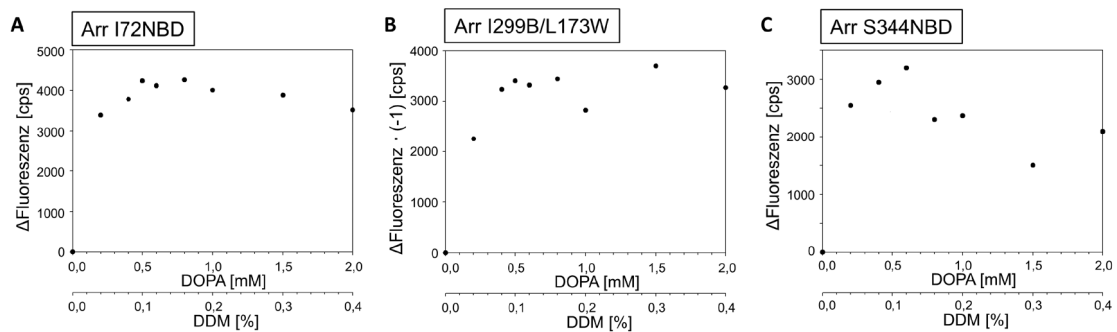
**Abbildung 21: Einfluss von DOPA auf Arrestin-pRho-Bindung**

3,2  $\mu\text{M}$  gereinigtes pRho in Puffer F in 0,1 % DDM (A) bzw. in 0,5 mM DOPA/0,1 % DDM (B) wurden mit 1,6  $\mu\text{M}$  Arr I72B versetzt und vor (dk) bzw. nach Belichtung (hv) Fluoreszenz gemessen. Kontrolle (grau) zeigt Fluoreszenzmessung von 1,6  $\mu\text{M}$  Arr I72B in Puffer F in 0,1 % DDM ohne pRho.

Abbildung 21 zeigt den Einfluss von Detergens (DDM) und negativ geladenem Phospholipid (DOPA) auf die Bindung von Arrestin I72B an hochphosphoryliertes, gereinigtes Rhodopsin bei isotonen Bedingungen (130 mM NaCl, pH = 7). Ohne die Zugabe von DOPA findet nach Belichtung nur eine minimale Bindung statt (Abbildung 21 A). Wird nun DOPA hinzugegeben (B), bindet Arrestin I72B nach Belichtung den aktivierten, hochphosphorylierten Rezeptor, was zu einem deutlichen Fluoreszenzanstieg führt. Vorversuche zum Einfluss von NaCl auf die Arr-pRho-Bindung unter DOPA/DDM-Bedin-

gungen zeigten, dass isotone Pufferbedingungen (130 mM NaCl, pH =7) keinen negativen Einfluss auf die Bindung haben und eine hohe Ionenstärke ( $> 300$  mM NaCl) zur Abnahme der Arrestinbindung führte (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend konnten für sämtliche weiteren Fluoreszenztitrationen 130 mM NaCl eingesetzt werden.

Um den Einfluss von DOPA/DDM auf die verwendeten Arrestinmutanten sowie auf deren Bindung an hochphosphoryliertes, solubilisiertes, gereinigtes Rhodopsin zu untersuchen, wurden DOPA/DDM-Titrationen mit Arr I72NBD, Arr I299B/L173W sowie Arr S344NBD durchgeführt (siehe Abbildung 22). DOPA/DDM-Zugabe führte bei allen drei Arrestinmutanten zur pRho-Bindung. Die Fluoreszenzänderung war einheitlich bei etwa 0,5 mM DOPA/ 0,1 % DDM am größten, weswegen diese Konzentration für nachfolgende Charakterisierungen der Arrestinbindung genutzt wurde.



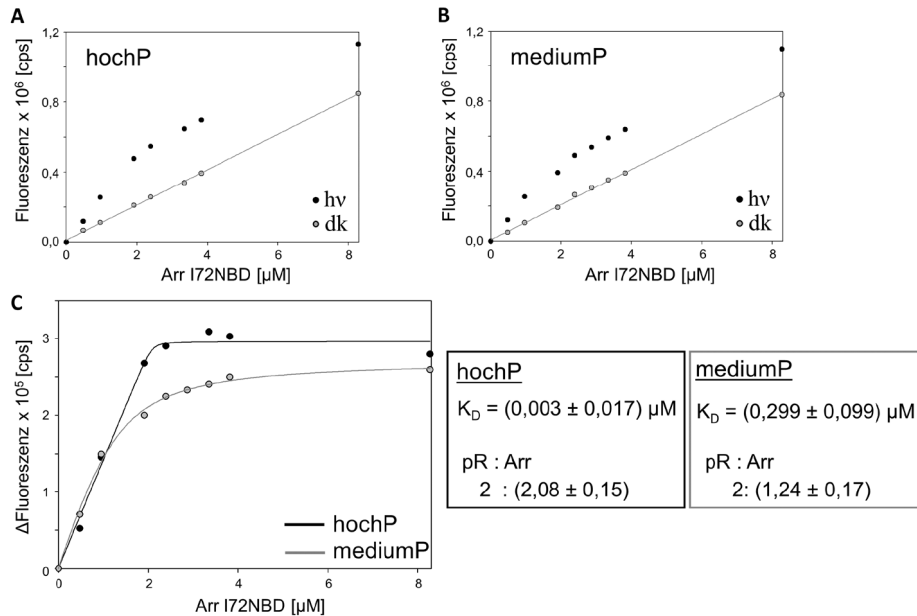
**Abbildung 22: DOPA-DDM-Einfluss auf pRho-Bindung verschiedener Arr-Mutanten**

Für die Untersuchung des DOPA-DDM-Einflusses auf die Arrestinbindung wurden 2  $\mu$ M hochphosphoryliertes, solubilisiertes, gereinigtes Rhodopsin und 2  $\mu$ M Arr I72NBD (A), I299B/L173W (B) sowie S344NBD (C) mit DOPA/DDM titriert. Dargestellt ist die Fluoreszenzänderung, welche aus der Differenz der Fluoreszenz nach Belichtung minus der Fluoreszenz im Dunklen ermittelt wurde.

Im Nachfolgenden wurde untersucht, wie sich die zuvor bestimmten DOPA/DDM-Bedingungen auf eine Arrestintitration zur Bestimmung der Rezeptorbindung auswirkten. In Abbildung 23 sind die Ergebnisse der Arr I72NBD-Titration mit hoch- (100 % Arrestinbindung in Extra Meta II-Messung) und mediumphosphoryliertem ( $\sim 75$  % Arrestinbindung in Extra Meta II-Messung), gereinigtem Rezeptor in DOPA/DDM-Puffer dargestellt. Wie zuvor schon in der Titrationsanalyse mit phosphoryliertem Rhodopsin (pRho) in Diskmembranen (vgl. Abbildung 20 auf Seite 48) liegt die Bindungsstöchiometrie bei der Verwendung von gereinigtem, hochphosphoryliertem Rhodopsin bei etwa 1 : 1



(pRho : Arr) und bei gereinigtem, mediumphosphoryliertem Rhodopsin bei etwa 2 : 1 (pRho : Arr).



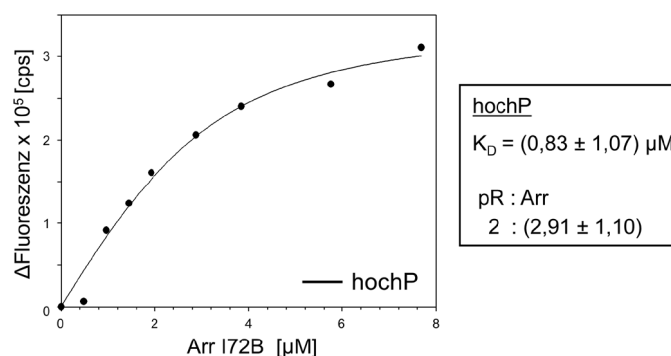
**Abbildung 23: Arr I72NBD-Titration mit DOPA/DDM**

Die Bindung von Arr I72NBD an phosphoryliertes, solubilisiertes, gereinigtes pRho kann über einen Fluoreszenzanstieg gemessen werden. ArrI72NBD wurde in Puffer F (0,5 mM DOPA/0,1 % DDM) gegen 2  $\mu$ M pRho (hochP (A) & mediumP (B)) titriert (Anregung bei 360 nm). Die Fluoreszenz wurde im Dunkeln (graue Punkte) und nach voller Photoaktivierung (schwarze Punkte) gemessen und die Fläche unter der Kurve integriert.  $\Delta$ Fluoreszenz (C) entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten, integrierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Spektrums (dk & hv). Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität ( $K_D$ ) und die Bindungsstöchiometrie; die zugehörigen Werte sind in den Boxen angegeben.

#### 2.4.2.2 Titrations mit Asolectin

Es wurden auch alternative Phospholipid-Systeme erprobt, um die Messbedingungen ggf. weiter optimieren zu können. Asolectin (Mischung aus mehrfach ungesättigten Phospholipiden aus der Sojabohne) wurde von Sommer und Farrens (2006) zur Rekonstitution von gereinigtem Rhodopsin verwendet. Für die Titration wurden 0,02 % Asolectin in 0,02 % DDM genutzt (siehe Abbildung 24). Verglichen mit der Bindungskurve in DOPA/DDM (siehe Abbildung 23) ist die Affinität mit Asolectin

( $K_D = (0,83 \pm 1,07) \mu\text{M}$ ) sehr viel geringer und die Bindungsstöchiometrie ( $2 : (2,91 \pm 1,10) \text{ pRho} : \text{Arr}$ ) weist einen wesentlich größeren Fehlerbereich auf. Demzufolge ist Asolectin nicht für die Bindungsanalyse geeignet.



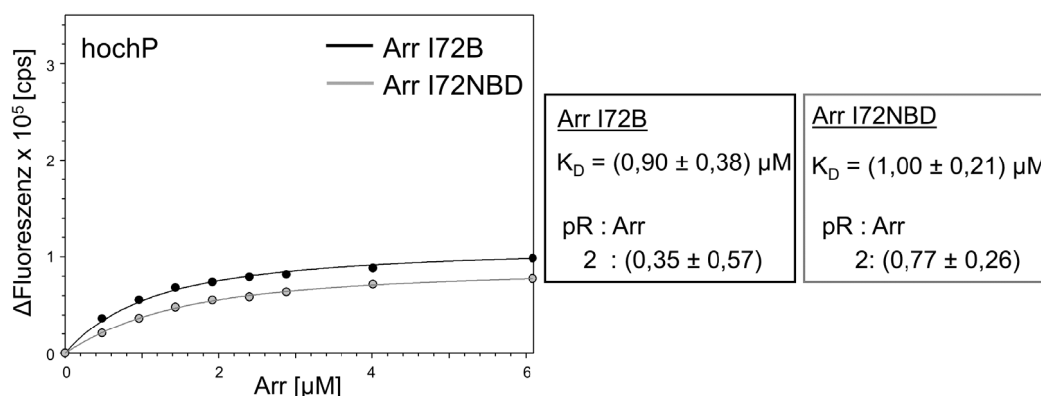
**Abbildung 24: Arr I72B-Titration mit Asolectin/DDM**

Arr I72B wurde in Puffer F mit 0,02 % Asolectin / 0,02 % DDM gegen 2  $\mu\text{M}$  pRho (hochP) titriert (Anregung bei 396 nm). Die Fluoreszenz wurde im Dunkeln und nach voller Photoaktivierung des Rezeptors gemessen und die Fläche unter der Kurve integriert.  $\Delta\text{Fluoreszenz}$  entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten, integrierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Spektrums. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität ( $K_D$ ) und die Bindungsstöchiometrie; die zugehörigen Werte sind in den Boxen angegeben.

### 2.4.2.3 Titrationsen mit einer Phospholipidmischung

Zur Rekonstitution von aufgereinigtem Rhodopsin wurde ebenfalls eine selbstzusammengestellte Mischung aus Phospholipiden, die in etwa dem nativen Verhältnis in ROS entspricht, verwendet. Die Mischung wird im Folgenden „Lipidemix“ genannt und setzt sich wie folgt zusammen (Sommer et al., 2006; siehe auch Abbildung 44 auf Seite 126): 40 % Phosphatidylcholin (DOPC), 40 % Phosphatidylethanolamin (DOPE) & 20 % Phosphatidylserin (DOPS). Nachdem in Vorversuchen die optimale Konzentration ermittelt wurde (siehe 6.3.5 auf Seite 153), wurde für die Arrestintitationen eine Konzentration von 1,5 mM Lipidemix/ 0,3 % DDM verwendet (siehe Abbildung 25). Die Kurven der beiden miteinander verglichenen Fluorophore (NBD und Bimane) sind sowohl von der Kurvenform als auch von der Fluoreszenzänderung sehr ähnlich. Sie unterscheiden sich jedoch sehr von der mit DOPA/DDM-gewonnenen Bindungskurve (siehe Abbildung 23

auf Seite 51). Besonders das Endniveau dieser Kurven ist sehr viel niedriger als bei der DOPA/DDM-Kurve. Die erhaltenen  $K_D$ -Werte sind viel höher und die Bindungsstöchiometrien liegen näher bei 2 : 1 (pRho : Arr), als bei dem zuvor auch schon bei den Membranen erhaltenen 1 : 1 (pRho : Arr). Somit ist auch dieser Lipidemix nicht für die Bindungsanalyse geeignet.



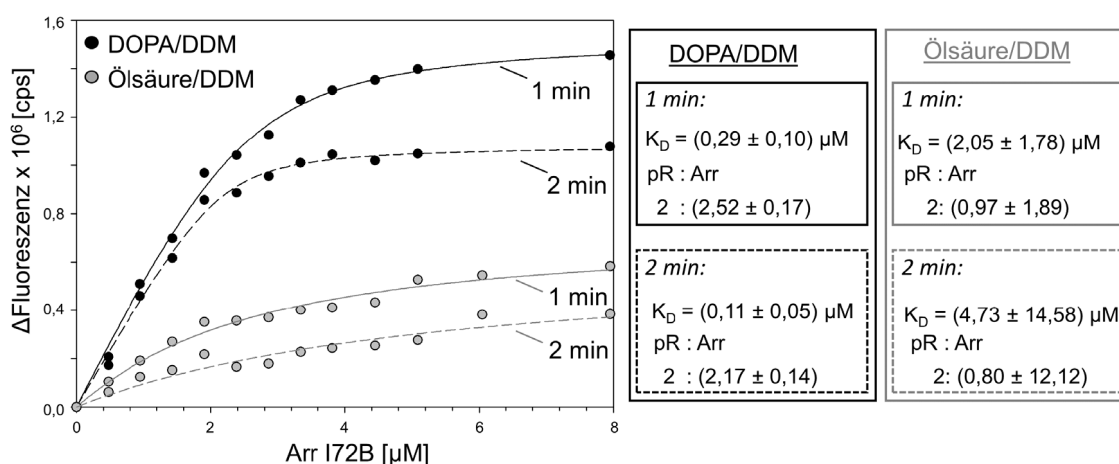
**Abbildung 25: Arr-Titration mit Lipidemix/DDM**

Arr I72B (schwarz) sowie Arr I72NBD (grau) wurden in Puffer F mit 1,5 mM Lipidemix/ 0,3 % DDM gegen 2  $\mu\text{M}$  pRho titriert (Anregung bei 396 nm für B; bei 360 nm für NBD). Die Fluoreszenz wurde im Dunkeln und nach voller Photoaktivierung des Rezeptors gemessen und die Fläche unter der Kurve integriert.  $\Delta$ Fluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten, integrierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Spektrums. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität ( $K_D$ ) und die Bindungsstöchiometrie; die zugehörigen Werte sind in den Boxen angegeben. Zur besseren Vergleichbarkeit mit den anderen Lipiden wurde der gleiche y-Achsenausschnitt wie in Abbildung 23 und Abbildung 24 gewählt.

#### 2.4.2.4 Titrations mit Ölsäure

Für eine definierte Mizellenbildung wurde abschließend Ölsäure (siehe Abbildung 43 auf Seite 125) als einfach ungesättigte Fettsäure analysiert. Im Gegensatz zu den zuvor verwendeten Phospholipiden (DOPA, Asolectin und Lipidemix), die relativ große und inhomogene Detergens/Phospholipid-Mizellen bilden, bildet Ölsäure kleinere Rezeptormizellen, welche vermutlich alle die gleiche Größe, Form und Dichte aufweisen. Damit wären unter Verwendung von Ölsäure die Arrestinbindungsmessungen reproduzierbarer, da weniger komplexe Strukturen gebildet werden. Nachdem zunächst die optimale Einsatzkonzentration der Ölsäure für die Titration bestimmt wurde (siehe 6.3.6 im Anhang ab

Seite 153), wurde eine Konzentration von 0,1 mM Ölsäure und 0,1 % DDM verwendet und eine Titration mit Arr I72B mit gereinigtem pRho (hochP) sowohl in Ölsäure/DDM als auch in DOPA/DDM durchgeführt (siehe Abbildung 26). Zusätzlich wurde die Fluoreszenz eine Minute sowie zwei Minuten nach Photoaktivierung des Rezeptors gemessen. Es ist deutlich zu erkennen, dass der Einsatz von DOPA/DDM zu einem höheren Endniveau der Titrationskurve führt, wohin gegen die Verwendung von Ölsäure eine sehr flache, runde Bindungskurve ergibt, bei der sowohl  $K_D$  sowie die Bindungsstöchiometrie mit einem sehr großen Fehler behaftet ist. Erneut liegt die DOPA/DDM-Kurve im Bereich von etwa 1 : 1 (pRho : Arr), wie es auch schon zuvor schon bei den Membranen (1 : 1) gemessen wurden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Verwendung von Ölsäure nicht geeignet ist.



**Abbildung 26: Arr I72B-Titration mit Ölsäure- bzw. DOPA/DDM**

Arr I72B wurde in Puffer F mit 0,1 mM Ölsäure/ 0,1 % DDM (grau) bzw. 0,5 mM DOPA/ 0,1 % DDM (schwarz) gegen 2  $\mu\text{M}$  pRho titriert (Anregung bei 396 nm). Die Fluoreszenz wurde im Dunkeln und 1 min (durchgängige Linie) bzw. 2 min (gestrichelte Linie) nach voller Photoaktivierung des Rezeptors gemessen und die Fläche unter der Kurve integriert.  $\Delta$ Fluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten, integrierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Spektrums. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität ( $K_D$ ) und die Bindungsstöchiometrie; die zugehörigen Werte sind in den Boxen angegeben.

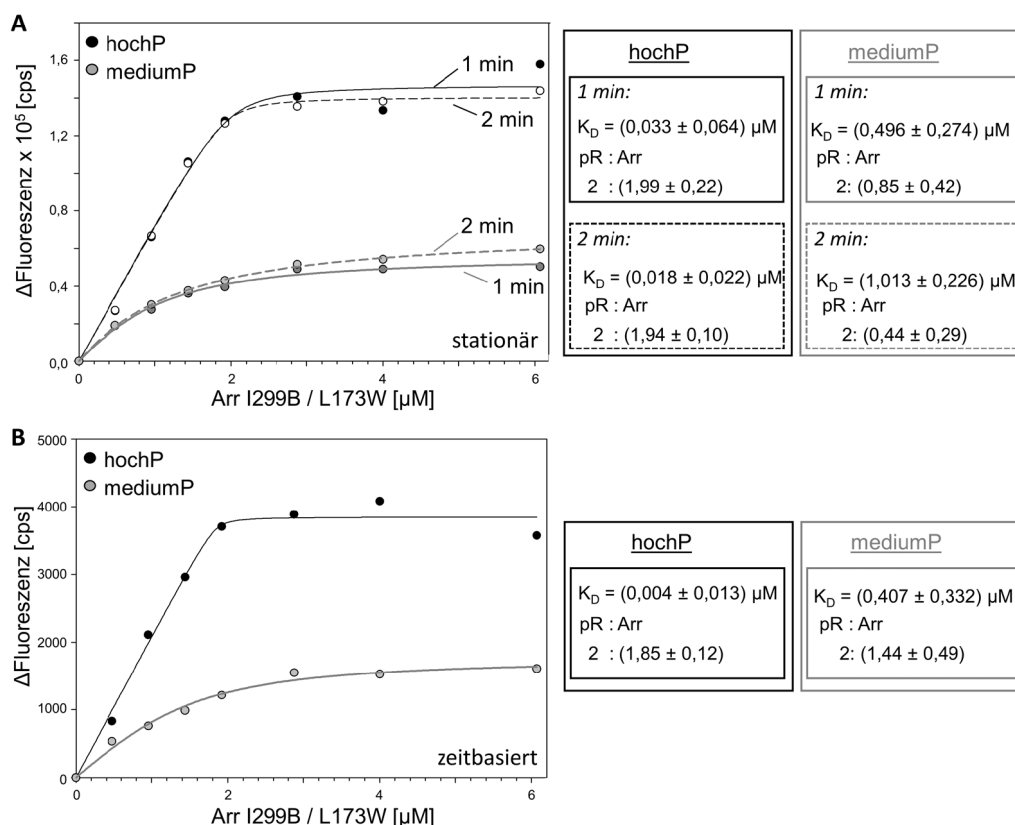
Die Ergebnisse zeigen, dass die DOPA/DDM-Kombination für die Bindungstitrationen am besten geeignet ist und daher für alle weiteren Versuche verwendet wurde. Die Ergebnisse in Abbildung 26 zeigen zudem, dass es einen Unterschied macht, zu welchem

Zeitpunkt die Fluoreszenz nach Photoaktivierung des Rezeptors gemessen wird. So sinkt das Endniveau der Kurve bei DOPA/DDM-Einsatz bereits zwei Minuten nach Photoaktivierung von  $(1,4 \times 10^6)$  cps auf  $(1,0 \times 10^6)$  cps, vermutlich weil belichtetes Rhodopsin zerfällt. Aus diesem Grund war es notwendig, die Fluoreszenzänderung über die Zeit zu verfolgen, um zu gewährleisten, dass die maximale Fluoreszenzänderung gemessen wurde, was einer maximalen Arrestin-Rhodopsin-Bindung entspricht.

#### 2.4.2.5 Titration mit DOPA mit Arr I299B/L173W

In den oben beschriebenen Vorversuchen wurden die optimalen Bedingungen für die Arrestintitrationen mit der Arrestinmutante Arr I72B bzw. Arr I72NBD ermittelt. Um die Auswirkung von gereinigten Rezeptorproben unterschiedlicher Phosphorylierung auf die Arrestinbindung zu analysieren, wurden auch ortsspezifische Fluoreszenzexperimente mit der Tor-Schleifen-Arrestinmutante (Arr I299B/L173W) durchgeführt. Ausgangsmaterial der gereinigten, aber ungetrennten phosphorylierten Proben bildeten hierfür 100 % sowie ~75 % arrestinbindendes, phosphoryliertes Rhodopsin (hochP und mediumP), dessen genaue Phosphorylierungsverteilung dem IEF-Gel in Abbildung 15 auf Seite 38 entnommen werden kann. Die Ergebnisse der Titrationsen sind in Abbildung 27 dargestellt und werden nachfolgend erläutert. Gleichzeitig wurden auch die zwei verschiedenen Verfahren gegenübergestellt, die zur Gewinnung der Titrationsfluoreszenzdaten genutzt werden können. Bei den stationären Fluoreszenzmessungen (*steady state fluorescence*) zeigt sich bei beiden pRho-Proben, dass sich die Fluoreszenzänderung, die genau eine Minute nach Photoaktivierung des Rezeptors bestimmt wurde, nur leicht von der nach zwei Minuten gemessenen unterscheidet. Allerdings ist das Endniveau der Kurve für die mediumphosphorylierte Rezeptorprobe etwa 2- bis 2,5-fach niedriger als das Endniveau der Kurve der hochphosphorylierten Probe. Auch bei der zeitbasierten Fluoreszenzmessung konnten mit den unterschiedlich phosphorylierten Proben die gleichen Ergebnisse erzielt werden. Hier war das Endniveau der Bindungskurve der hochphosphorylierten Probe etwa doppelt so hoch wie die der mediumphosphorylierten. Wie zuvor schon in der Titrationsanalyse mit den phosphorylierten Rhodopsinmembranproben (vgl. Abbildung 20 auf Seite 48) liegen die Bindungsstöchiometrien bei Verwendung von hochphosphorylierten pRho bei etwa 1 : 1 (pRho : Arr) und bei mediumphosphorylierten pRho bei etwa 2 : 1 (pRho : Arr),

wobei sich bei letzteren die Werte in den beiden Verfahren zur Titrationsdatengewinnung unterscheiden. So wird bei der stationären Fluoreszenzmessung eine Stöchiometrie von 2 : (0,85 ± 0,4) (für 1 min) bzw. 2 : (0,44 ± 0,29) (für 2 min) ermittelt, wohingegen bei der zeitbasierten Fluoreszenzmessung eine Stöchiometrie von 2 : (1,44 ± 0,49) ermittelt wurde (jeweils pRho : Arr).



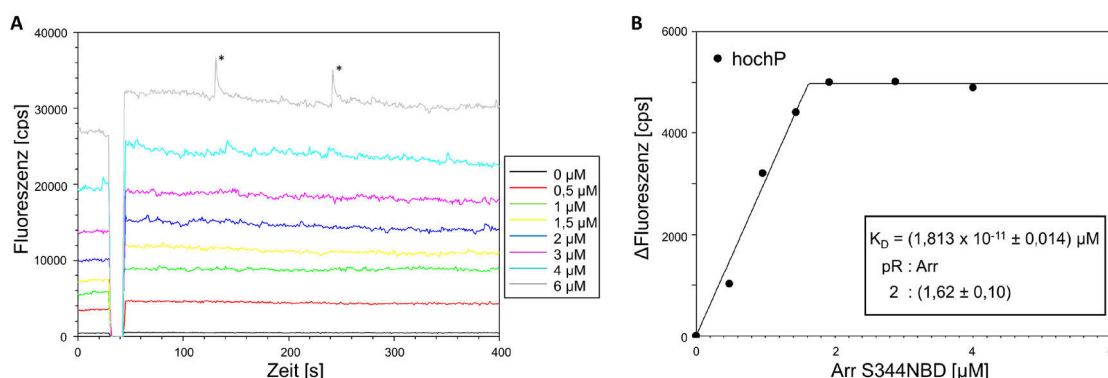
**Abbildung 27: Arr I299B/L173W-Titration mit DOPA/DDM im Vergleich**

Die Bindung von Arr I299B/L173W an gereinigtes pRho wurde über einen Fluoreszenzabfall gemessen. Arr I299B/L173W wurde in Puffer F mit 0,5 mM DOPA/ 0,1 % DDM gegen 2  $\mu\text{M}$  pRho (hochP in schwarz bzw. mediumP in grau) titriert (Anregung: 396 nm; Emission: 424 nm bis 600 nm (A) bzw. 467 nm (B)). (A) Die Fluoreszenz wurde im Dunkeln und 1 min (durchgängige Linie) bzw. 2 min (gestrichelte Linie) nach voller Photoaktivierung des Rezeptors gemessen und die Fläche unter der Kurve integriert. (B) Die Fluoreszenzmessung wurde im Dunkeln gestartet, dann wurde der Rezeptor für 10 s photoaktiviert und die Fluoreszenz gemessen, bis ein konstantes Signal erreicht wurde. (A, B)  $\Delta$ Fluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten, integrierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Signals. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität ( $K_D$ ) und die Bindungsstöchiometrie; die zugehörigen Werte sind in den Boxen angegeben.

Die hohen Fehler für die Stöchiometrie sind systembedingt: Da bei der Auswertung der Titrationskurven ein größerer  $K_D$ -Wert auch zu einem größeren Fehler der Stöchiometrie führt. Beachtet man die Fehlerbereiche, so liegt die Stöchiometrie für die mediumphosphorylierte Rezeptorprobe wie bei den Membranen eher bei 2 : 1 (pRho : Arr), obwohl bei der Methode der zeitbasierten Fluoreszenzmessung durch den hohen Fehler keine klare Aussage zur Stöchiometrie (mit 2 :  $(1,44 \pm 0,49)$  (pRho : Arr)) getroffen werden kann. Die vollständigen Titrationsdaten der Fluoreszenzmessungen sind in den Abschnitten 6.3.7 und 6.3.8 ab Seite 155 dargestellt.

#### 2.4.2.6 Titration mit DOPA mit Arr S344NBD

Um die Auswirkung der unter 2.4.2 bestimmten DOPA/DDM-Bedingungen auf die Arrestinbindung von gereinigten, hochphosphorylierten Rezeptorproben zu ermitteln, wurden ebenfalls ortsspezifische Fluoreszenzexperimente mit der Arrestinmutante Arr S344NBD durchgeführt.



**Abbildung 28: Arr S344NBD-Titration mit DOPA/DDM**

Die Bindung von Arr S344NBD an solubilisiertes, gereinigtes pRho wurde über einen zeitbasierten Fluoreszenzanstieg gemessen. 0 µM bis 6 µM Arr S344NBD wurden in Puffer F mit 0,5 mM DOPA/ 0,1 % DDM gegen 2 µM pRho (hochP) titriert (Anregung bei 360 nm, Emission bei 550 nm). (A) Die Fluoreszenzmessung wurde im Dunkeln gestartet (0 s bis 20 s), dann wurde der Rezeptor für 10 s photoaktiviert und nachfolgend der Fluoreszenzanstieg gemessen, bis ein konstantes Signal erreicht wurde. (B)  $\Delta$ Fluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsabgezogenen Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Signals. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität ( $K_D$ ) und die Bindungsstöchiometrie; die zugehörigen Werte sind in den Boxen angegeben. Die Sternchen (\*) markieren messgerätbedingte Artefakte.

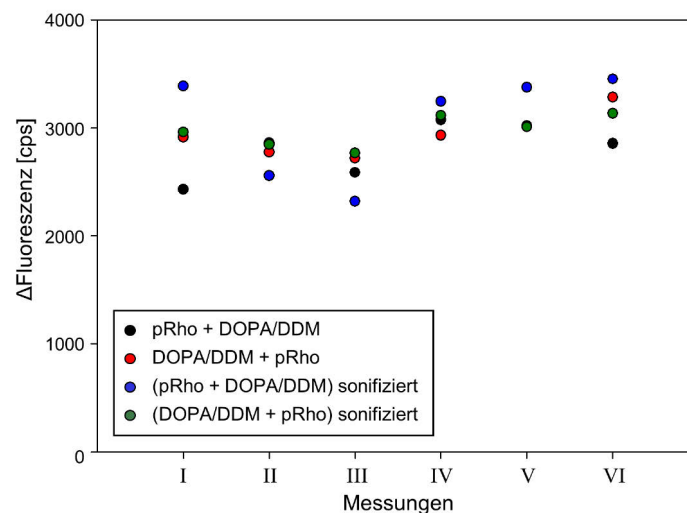
Die genaue Phosphorylierungsanzahl kann dem IEF-Gel in Abbildung 15 auf Seite 38 entnommen werden. Für diese Arrestinmutante wurden nur zeitbasierte Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Die Ergebnisse der Titrationsen sind in Abbildung 28 dargestellt. Wie zuvor schon in der Titrationsanalyse mit den ursprünglich hochphosphorylierten Rhodopsinmembranproben (vgl. Abbildung 20 auf Seite 48) liegt die Bindungsstöchiometrie bei etwa 1 : 1 (pRho : Arr).

#### **2.4.2.7 Vergleich der unterschiedlichen DOPA/DDM-pRho-Spezies-Herstellung für Arrestintitrationsen**

Um eine reproduzierbare Mizellenbildung für die Arrestintitrationsen gewährleisten zu können, wurden unterschiedliche Methoden zur Herstellung der DOPA/DDM-pRho-Mizellen miteinander verglichen und optimiert. Der Einfluss der unterschiedlichen DOPA/DDM-Präparationen wurde in Hinblick auf Schwankungen der Fluoreszenzmessungen nach Arrestinbindung untersucht (siehe Abbildung 29). Hierfür wurden vier unterschiedliche DOPA/DDM-pRho-Präparationen in sechs unabhängigen Messungen an zwei verschiedenen Tagen (Messungen I bis III an Tag 1; Messungen IV bis VI an Tag 2) unter folgenden Bedingungen untersucht: nach zehn Sekunden Sonifizierung der DOPA/DDM-Ausgangssprobe wurde für Bedingung 1 erst die pRho-Spezies im Gefäß vorgelegt und anschließend DOPA/DDM hinzugefügt (schwarze Punkte) bzw. für Bedingung 2 erst DOPA/DDM im Gefäß vorgelegt und anschließend pRho-Spezies hinzugefügt (rote Punkte) bzw. für Bedingung 3 erst pRho-Spezies im Gefäß vorgelegt, dann DOPA/DDM hinzugefügt und danach die Mischung erneut für zehn Sekunden sonifiziert (blaue Punkte) oder für Bedingung 4 erst DOPA/DDM im Gefäß vorgelegt, dann pRho-Spezies hinzugefügt und anschließend die Mischung für zehn Sekunden sonifiziert (grüne Punkte). Für jede dieser Mischungen wurde eine frische DOPA/DDM-Ausgangslösung verwendet. Die Mischungen wurden dann in ihrer Arr S344NBD-Bindung untersucht. Es zeigt sich, dass die geringsten Schwankungen auftreten, wenn das DOPA/DDM-Gemisch vorgelegt und pRho anschließend vorsichtig hinzugegeben wurde (rote und grüne Punkte in Abbildung 29). Aus diesem Grund wurde das Gemisch aus DOPA/DDM und pRho-Spezies für die fluoreszenzbasierten Titrationsen immer auf die



gleiche Weise angesetzt, um die Schwankungen durch Unterschiede im DOPA/DDM-Gemisch und der Mizellenbildung zu minimieren. Zu Beginn wurde die frisch aufgetaute DOPA/DDM-Ausgangslösung für zehn Sekunden sonifiziert und in einem Gefäß vorgelegt. Anschließend wurde die frisch aufgetaute pRho-Spezies-Probe hinzugegeben. Hierbei wurde darauf geachtet, dass jeweils die gleiche Anzahl an Pipettievorgängen bei der Durchmischung von DOPA/DDM und pRho angewandt wurde und dass die Probe dann exakt die gleiche Zeit auf der gleichen Stufe gevortext und anschließend für 30 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Diese Inkubationszeit war nötig, damit sich die benötigten Mizellen formen konnten.



**Abbildung 29: Vergleich von DOPA/DDM-pRho-Spezies-Präparationen**

Jeweils 4  $\mu\text{M}$  Arr S344NBD wurden mit 2  $\mu\text{M}$  pRho-Spezies (4/5/6/7-P #D<sub>RS21</sub>) in Puffer F mit 0,5 mM DOPA/ 0,1 % DDM gemessen (Anregung: 360 nm, Emission: 550 nm). Vier unterschiedliche DOPA/DDM-pRho-Präparationen wurden dafür in sechs unabhängigen Messungen an zwei verschiedenen Tagen (I bis III an Tag 1; IV bis VI an Tag 2) untersucht. Nach 10 s Sonifizierung der DOPA/DDM Ausgangsprobe wurde angesetzt: 1. pRho vorgelegt und DOPA/DDM hinzugefügt (schwarz); 2. DOPA/DDM vorgelegt und pRho hinzugefügt (rot); 3. pRho vorgelegt, DOPA/DDM hinzugefügt und die Mischung 10 s sonifiziert (blau); DOPA/DDM vorgelegt, pRho hinzugefügt und die Mischung 10 s sonifiziert (grün). Die Fluoreszenzmessung wurde im Dunkeln gestartet (0 s bis 20 s), dann wurde der Rezeptor für 10 s photoaktiviert und nachfolgend der Fluoreszenzanstieg gemessen, bis ein konstantes Signal erreicht wurde.  $\Delta\text{Fluoreszenz}$  entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Signals.

### 2.4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse für ungetrenntes pRho

Ein Überblick sämtlicher in dieser Arbeit erhaltenen Titrationsergebnisse mit ungetrenntem pRho sowohl in Diskmembranen als auch in verschiedenen Detergens/Phospholipid-Zusammensetzungen ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2:** Titrationsergebnisse der ungetrennten pRho-Proben

				hochP		mediumP	
Abb.	Arrestinmutante	Bedingungen		K <sub>D</sub> [μM]	pRho : Arr	K <sub>D</sub> [μM]	pRho : Arr
20	Arr I72NBD	St	M	0,30 ± 0,29	2 : (2,05 ± 0,53)	0,90 ± 0,50	2 : (0,34 ± 0,71)
23		St	D	0,003 ± 0,017	2 : (2,08 ± 0,15)	0,299 ± 0,099	2 : (1,24 ± 0,17)
25		St	L	1,00 ± 0,21	2 : (0,77 ± 0,26)	n.d.	n.d.
24	Arr I72B	St	A	0,83 ± 1,07	2 : (2,91 ± 1,10)	n.d.	n.d.
25		St	L	0,90 ± 0,38	2 : (0,35 ± 0,57)	n.d.	n.d.
26		St	D <sub>1 min</sub>	0,29 ± 0,10	2 : (2,52 ± 0,17)	n.d.	n.d.
26		St	D <sub>2 min</sub>	0,11 ± 0,05	2 : (2,17 ± 0,14)	n.d.	n.d.
26		St	Ö <sub>1 min</sub>	2,05 ± 1,78	2 : (0,97 ± 1,89)	n.d.	n.d.
26		St	Ö <sub>2 min</sub>	4,73 ± 14,58	2 : (0,80 ± 12,12)	n.d.	n.d.
27	Arr I299B/L173W	St	D <sub>1 min</sub>	0,033 ± 0,064	2 : (1,99 ± 0,22)	0,496 ± 0,274	2 : (0,85 ± 0,42)
27		St	D <sub>2 min</sub>	0,018 ± 0,022	2 : (1,94 ± 0,10)	1,013 ± 0,226	2 : (0,44 ± 0,29)
27		Z	D	0,004 ± 0,013	2 : (1,85 ± 0,12)	0,407 ± 0,332	2 : (1,44 ± 0,49)
28	Arr S344NBD	Z	D	1,8 x 10 <sup>-11</sup> ± 0,01	2 : (1,62 ± 0,10)	n.d.	n.d.
<b>Abkürzungen in der Tabelle</b> A 0,02 % Asolectin in 0,02 % DDM Abb. Daten dargestellt in Abbildung D 0,5 mM DOPA in 0,1 % DDM L 1,5 mM Lipidemix in 0,3 % DDM M Membranen: ohne zugesetzte Phospholipide n.d. nicht in dieser Abbildung dargestellt/gemessen Ö 0,1 mM Ölsäure in 0,1 % DDM St stationäre Fluoreszenzmessung ( <i>steady state fluorescence measurement</i> ) Z zeitbasierte Fluoreszenzmessung ( <i>time-based fluorescence measurement</i> )							

### 2.4.4 Titrationen mit pRho-Spezies

Nach der Auftrennung der verschieden phosphorylierten, gereinigten Rhodopsin-Spezies (siehe 2.3 ab Seite 41) und der Bestimmung der geeigneten Lipidbedingungen für die Arrestinbindungsanalysen (0,5 mM DOPA/ 0,1 % DDM, pH = 7, isoton in Puffer F)

konnten, wie unter 2.4.2.6 ab Seite 57 beschrieben, ortsspezifische Fluoreszenzexperimente durchgeführt werden. Im Folgenden werden die Titrationsergebnisse der einzelnen Arrestinmutanten mit den aufgetrennten pRho-Spezies nacheinander vorgestellt.

#### 2.4.4.1 Titrationsen mit Arr I72NBD

Um die Auswirkung verschiedener Phosphorylierungsniveaus des Rhodopsins auf die Arrestinbindung zu untersuchen, wurden ortsspezifische Fluoreszenzexperimente mit der Arrestinmutante der Finger-Schleife, Arr I72NBD, durchgeführt. Wenn die Finger-Schleife in der N-Domäne des Arrestins den aktiven, phosphorylierten Rezeptor bindet, kommt es zu einem messbaren Fluoreszenzanstieg. Ausgangsmaterial der phosphorylierten Rhodopsin-Spezies bildeten hierfür die aufgetrennten Fraktionen der RS-Läufe #17, #19, #20 sowie #21 (siehe 2.3 ab Seite 41). Die Ergebnisse der Titrationsen sind in Abbildung 30 dargestellt und werden nachfolgend erläutert: Abbildung 30 A zeigt eine komplette Arr I72NBD-Titration mit den pRho-Spezies des RS-Laufes #21. Die einzelnen Datenpunkte jeder Titration schwanken nur sehr gering und konnten jeweils zu einer Bindungskurve angepasst werden, die die Lage dieser Punkte sehr gut wiedergibt. Die orangene Spur zeigt die Datenpunkte der Fraktion #B<sub>RS21</sub> (3/4/5-P) und bildet damit die erste Fraktion aus dem RS-Lauf mit dem niedrigsten Phosphorylierungsniveau ab, bei dem die Hauptphosphorylierung bei 5 Phosphaten liegt. Die ermittelte Stöchiometrie liegt bei 2 : 1,1 (pRho : Arr).

Schon die nächsthöhere Phosphorylierungsfraktion (#C<sub>RS21</sub>, 4/5/6-P, cyanfarbene Spur) mit hauptsächlich sechs Phosphaten führt zu einem höheren Endniveau der Bindungskurve. Die Stöchiometrie steigt hierbei etwas an auf 2 : 1,4 (pRho : Arr). Die anschließend eluierte Fraktion (#D<sub>RS21</sub>, 4/5/6/7-P, grüne Spur) beinhaltet eine Mischung aus vier verschiedenen Phosphorylierungsniveaus, wobei die Hauptphosphorylierung wieder bei fünf Phosphaten liegt. Die Titrationskurve zeigt in Doppelbestimmung die größte Fluoreszenzänderung aller Einzeltitrationsen mit dem höchsten Endniveau. Ebenso steigt die ermittelte Bindungsstöchiometrie auf 2 : 1,7 (pRho : Arr). Bei der Titration mit #E<sub>RS21</sub>, der nächsten eluierten Fraktion (5/6/7-P, dunkelblaue Spur), fällt das Endniveau wieder knapp auf die Höhe des Endniveaus der cyanfarbenen Spur, welche die #C<sub>RS21</sub>-Spur mit 4/5/6-P wiedergibt. Ebenfalls sinkt die Stöchiometrie wieder auf 2 : 1,4 (pRho : Arr).

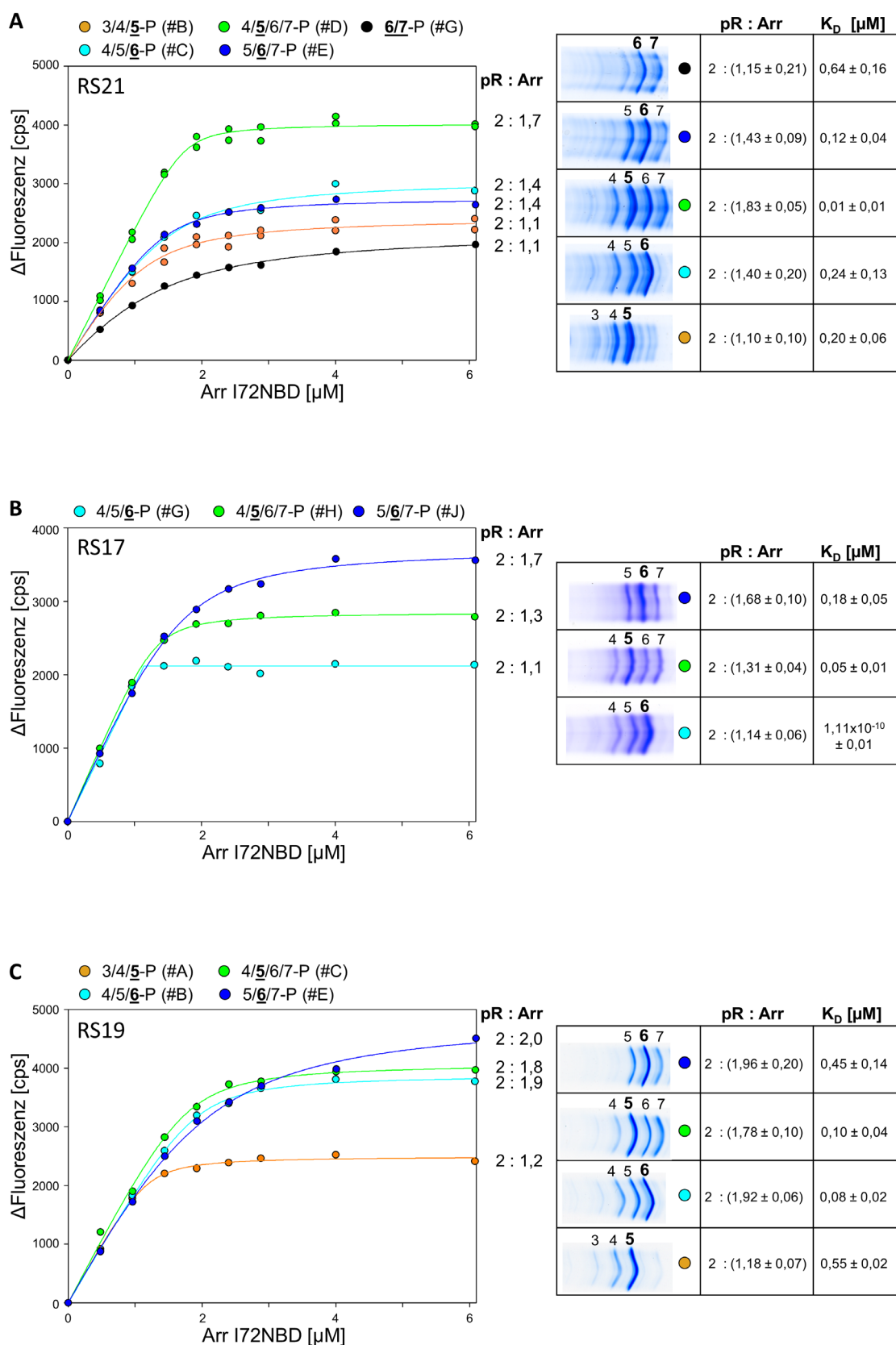
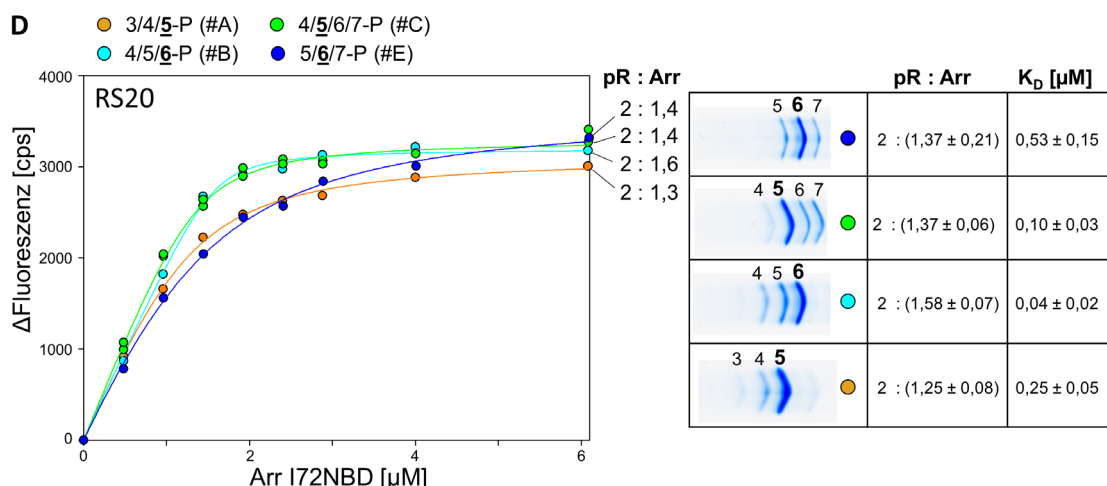


Abbildung 30: Arr I72NBD-Titration mit pRho-Spezies



**Abbildung 30 (fortgesetzt): Arr I72NBD-Titration mit pRho-Spezies**

Die Bindung von Arr I72NBD an pRho-Spezies (Aufreinigungslauf RS17 (A), RS19 (B), RS20 (C), RS21 (D)) wurde über einen zeitbasierten Fluoreszenzanstieg gemessen. 0  $\mu$ M bis 6  $\mu$ M Arr I72NBD wurden in Puffer F mit 0,5 mM DOPA/ 0,1 % DDM gegen 2  $\mu$ M pRho-Spezies (siehe verschiedene Farben für Phosphorylierungsniveaus sowie IEF-Gelausschnitte rechts neben den Bindungskurven) titriert (Anregung: 360 nm, Emission: 550 nm). Die Hauptphosphorylierung wurde unterstrichen/fett dargestellt. Die Fluoreszenzmessung wurde im Dunkeln gestartet (0 s bis 20 s), dann wurde der Rezeptor für 10 s photoaktiviert und nachfolgend der Fluoreszenzanstieg gemessen, bis ein konstantes Signal erreicht wurde.  $\Delta$ Fluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsabtrahierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Signals. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität ( $K_D$ ) und die Bindungsstöchiometrie; die zugehörigen Werte sind in den Boxen angegeben.

Die schwarze Spur zeigt die Titrationsergebnisse mit der Fraktion mit dem höchsten Phosphorylierungsniveau: # $G_{RS21}$ , 6/7-P. Interessanterweise sinkt auch hier das Endniveau unterhalb des Niveaus der Kurve, welche mit der niedrigsten Phosphorylierung erzielt wurde. Zusätzlich fällt die Stöchiometrie auf 2 : 1,1 (pRho : Arr).

In Abbildung 30 B sind die Titrationsergebnisse mit den pRho-Spezies 4/5/6-P (#G), 4/5/6/7-P (#H) sowie 5/6/7-P (#J) aus RS17 dargestellt. Mit steigendem Phosphorylierungsniveau steigen auch hier, ähnlich wie mit den pRho-Spezies aus RS21, die Endniveaus der Bindungskurven sowie die Bindungsstöchiometrie von etwa 2 : 1 auf 2 : 1,7 (pRho : Arr). Vergleicht man dieses Ergebnis mit den erhaltenen Bindungsstöchiometrien der pRho-Spezies aus RS19 (Abbildung 30 C), so ist eine ähnliche Entwicklung erkenn-

bar. Allerdings unterscheiden sich die für 4/5/6-P (#B<sub>RS19</sub>) und 4/5/6/7-P (#C<sub>RS19</sub>) gemessenen Bindungsstöchiometrien mit etwa 2 : 1,9 deutlich von den aus RS17 gewonnenen 4/5/6-P (#G<sub>RS17</sub>) und 4/5/6/7-P (#H<sub>RS17</sub>), welche niedriger liegen. Für RS17 und RS19 wurden jeweils nur Phosphorylierungsniveaus bis 5/6/7-P untersucht, da aus den höherphosphorylierten Fraktionen nicht genug Material zur Verfügung stand. Im Gegensatz zur Fraktion 5/6/7-P aus RS21 fallen bei den Fraktionen aus RS17 und RS19 die Endniveaus der Titrationskurven und die Bindungsstöchiometrien nicht. Somit konnte der Trend aus Abbildung 30 A nicht bestätigt werden, dass bei höherphosphorylierten Fraktionen (6/7-P) sowohl Endniveau der Titrationskurve als auch Bindungsstöchiometrie wieder fallen. Ebenso unterscheiden sich die ermittelten Bindungsstöchiometrien der pRho-Spezies aus RS20 und RS21 signifikant von den anderen beiden RS-Läufen (Abbildung 30 A & D). Obwohl die IEF-Phosphorylierungsanalyse der jeweiligen Fraktionen die gleiche Bandenzusammensetzung ergibt, zeigen sie erhebliche Unterschiede in den ermittelten Bindungsstöchiometrien. Aufgrund der hohen Schwankungen der Endniveaus der Titrationskurven, die auch über verschiedene Normalisierungsverfahren nicht gelöst werden konnten, ist ein Zusammenfassen der gleichen Phosphorylierungsniveau-Fraktionen verschiedener RS-Läufe nicht sinnvoll (siehe Diskussion ab Seite 79).

#### 2.4.4.2 Titrationsen mit Arr I299B/L173W

Weitere ortsspezifische Fluoreszenzexperimente wurden mit der Arrestinmutante der Tor-Schleife, Arr I299B/L173W, durchgeführt, um die Auswirkung verschiedener pRho-Spezies auf die Arrestinbindung zu untersuchen. Durch Konformationsänderungen innerhalb der Tor-Schleife kommt es nach Rezeptorbindung durch Arrestin zu einem Abfall der Fluoreszenz, da das zusätzlich eingebrachte Tryptophan in Fluorophornähe kommt und die Fluoreszenz löscht. Ausgangsmaterial der pRho-Spezies bildeten hierfür die aufgetrennten Fraktionen der RS-Läufe #17, #20, #21 sowie #25 (siehe 2.3 ab Seite 41 und Abbildung 49 ab Seite 150). Die Ergebnisse der Titrationsen sind in Abbildung 31 und Abbildung 54 auf Seite 157 dargestellt und werden nachfolgend erläutert: Auffällig ist, dass auch bei den Arr I299B/L173W-Titrationsen die einzelnen Datenpunkte der Titrationsen nur sehr wenig schwanken. Die pRho-Spezies aus RS17 wurden zweimal titriert (Messung 1 (Abbildung 31 A) und 2 (Abbildung 31 B)).

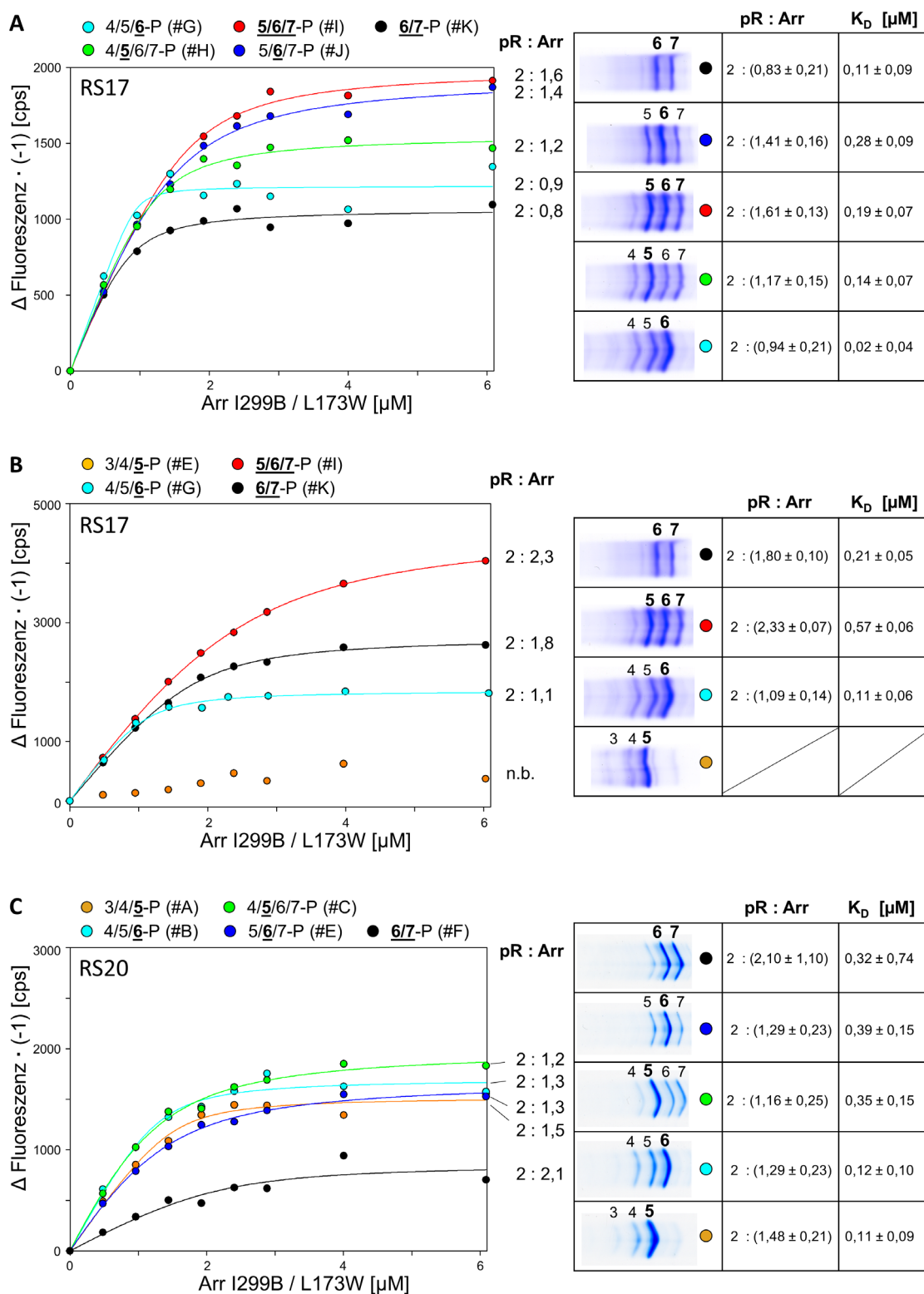
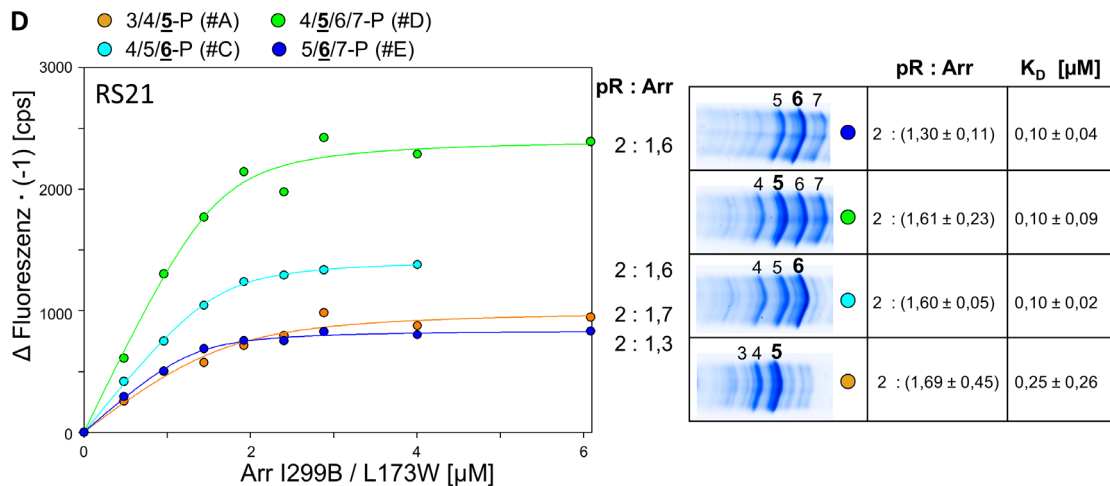


Abbildung 31: Arr I299B/L173W-Titration mit pRho-Spezies



**Abbildung 31 (fortgesetzt): Arr I299B/L173W-Titration mit pRho-Spezies**

Die Bindung von Arr I299B/L173W an pRho-Spezies (Aufreinigungslauf RS17 Messung 1 (A) & Messung 2 (B); RS20 (C) & RS21 (D)) wurde über einen zeitbasierten Fluoreszenzanstieg gemessen. 0  $\mu$ M bis 6  $\mu$ M Arr I299B/L173W wurden in Puffer F mit 0,5 mM DOPA/ 0,1 % DDM gegen 2  $\mu$ M pRho-Spezies (siehe verschiedene Farben für Phosphorylierungsniveaus sowie IEF-Gelausschnitte rechts neben den Bindungskurven) titriert (Anregung: 400 nm, Emission: 467 nm). Die Hauptphosphorylierung wurde unterstrichen/fett dargestellt. Die Fluoreszenzmessung wurde im Dunkeln gestartet (0 s bis 20 s), dann wurde der Rezeptor für 10 s photoaktiviert und nachfolgend der Fluoreszenzanstieg gemessen, bis ein konstantes Signal erreicht wurde.  $\Delta$ Fluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Signals. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität ( $K_D$ ) und die Bindungsstöchiometrie (n.b. für „nicht bestimmt“); die zugehörigen Werte sind in den Boxen angegeben.

Mit steigendem Phosphorylierungsniveau steigt die Bindungsstöchiometrie (pRho : Arr) aus Messung 1 mit pRho-Spezies aus RS17 von etwa 2 : 1 für 4/5/6-P (# $I_{RS17}$ ) auf 2 : 1,6 für 5/6/7-P (# $I_{RS17}$ ) und sinkt dann wieder auf 2 : 1 für 6/7-P (# $K_{RS17}$ ) (Abbildung 31 A). Vergleicht man dieses Ergebnis mit den Bindungsstöchiometrien aus Messung 2 der pRho-Spezies aus RS17 (Abbildung 31 B), so ist eine ähnliche Tendenz erkennbar, jedoch sind die absoluten Zahlenwerte für #I und #K nicht übereinstimmend.

Somit geben die Titrationsergebnisse die Beobachtungen für die pRho-Spezies aus RS17 (siehe 2.4.4.1 ab Seite 61) in sofern wieder, als dass das Endniveau der Titrationskurve mit steigendem Phosphorylierungsniveau erst ansteigt und dann wieder fällt (für ein hohes Phosphorylierungsniveau von 6/7-P oder höher). Für die Endniveaus der Kurven, die



mit pRho-Spezies aus RS20 sowie RS21 ermittelt wurden (Abbildung 31 C & D), ist diese Tendenz ebenso erkennbar, jedoch sind die erhaltenen Bindungsstöchiometrien signifikant unterschiedlich. Vergleicht man nun die Endniveaus der Titrationskurven der pRho-Spezies aus RS25 mit den oben beschriebenen Ergebnissen, ist hier eine solche Tendenz nur zum Teil feststellbar (siehe Abbildung 54 auf Seite 157). Hier ist das Endniveau der Titrationskurve der niedrig phosphorylierten Rezeptorprobe ( $3/4/5\text{-P}$  # $\text{A}_{\text{RS25}}$  & # $\text{B}_{\text{RS25}}$ ) ebenfalls niedrig und steigt ab sechs Phosphaten, jedoch bleibt sie für alle höheren Phosphorylierungsniveaus in etwa gleich hoch. Die absoluten Bindungsstöchiometrierwerte sind auch in diesen beiden Messungen ( $\text{I}_{\text{RS25}}$  und  $\text{II}_{\text{RS25}}$ ) nicht übereinstimmend.

#### 2.4.4.3 Titrationen mit Arr S344NBD

Um die Auswirkung verschiedener Phosphorylierungsniveaus des Rhodopsins auf die Arrestinbindung zu untersuchen, wurden ebenfalls ortsspezifische Fluoreszenzexperimente mit der Arrestinmutante der 344-Schleife der C-Domäne, Arr S344NBD, durchgeführt. Durch Bindung des Arrestins von pRho steigt die Fluoreszenz, wenn der Fluorophor mit den Lipiden oder einem benachbartem Rhodopsin interagiert. Ausgangsmaterial der pRho-Spezies bildeten die aufgetrennten Fraktionen der RS-Läufe #17, #19, #20 sowie #21 (siehe 2.3 ab Seite 41). Die Ergebnisse der Titrationen sind in Abbildung 32 dargestellt und werden nachfolgend erläutert.

In Abbildung 32 A ist eine komplette Arr S344NBD-Titration mit den pRho-Spezies des RS-Laufes #17 dargestellt. Die einzelnen Datenpunkte jeder einzelnen Titration schwanken nur sehr gering und konnten jeweils zu einer Bindungskurve angepasst werden, die die Lage dieser Punkte sehr gut wiedergibt. Die rosafarbene Spur zeigt die Datenpunkte der Fraktion # $\text{D}_{\text{RS17}}$  ( $3/4/4\text{-P}$ ) und bildet damit die erste Fraktion aus dem RS-Lauf mit dem niedrigsten Phosphorylierungsniveau ab, bei dem die Hauptphosphorylierung bei vier Phosphaten liegt. Die ermittelte Stöchiometrie liegt bei  $2 : 0,5$  (pRho : Arr). Die orangefarbene Spur zeigt die Datenpunkte der Fraktion # $\text{F}_{\text{RS17}}$  ( $3/4/5\text{-P}$ ), bei der die Hauptphosphorylierung bei fünf Phosphaten liegt. Die dazugehörige Stöchiometrie liegt bei  $2 : 0,7$  (pRho : Arr).

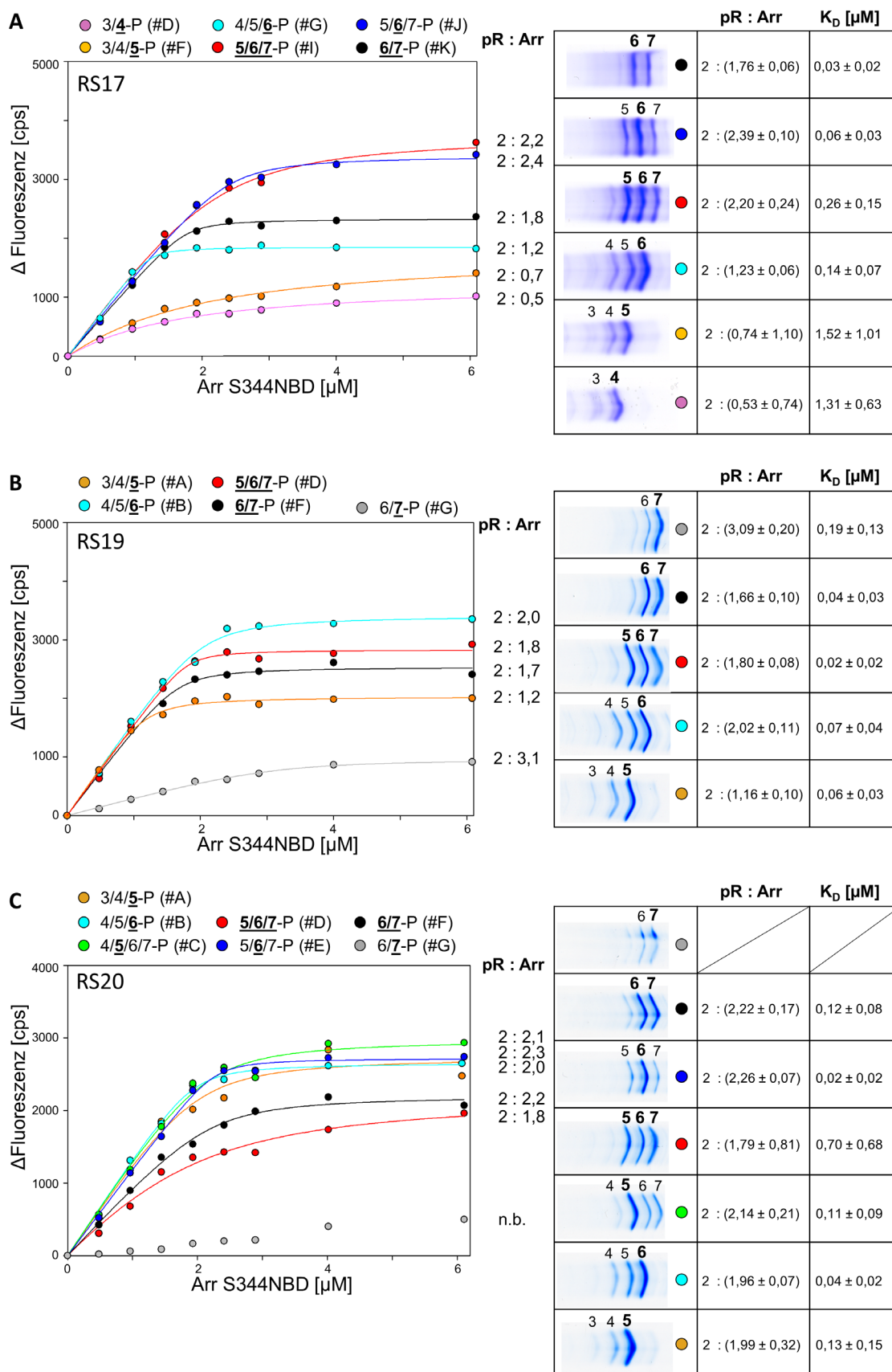
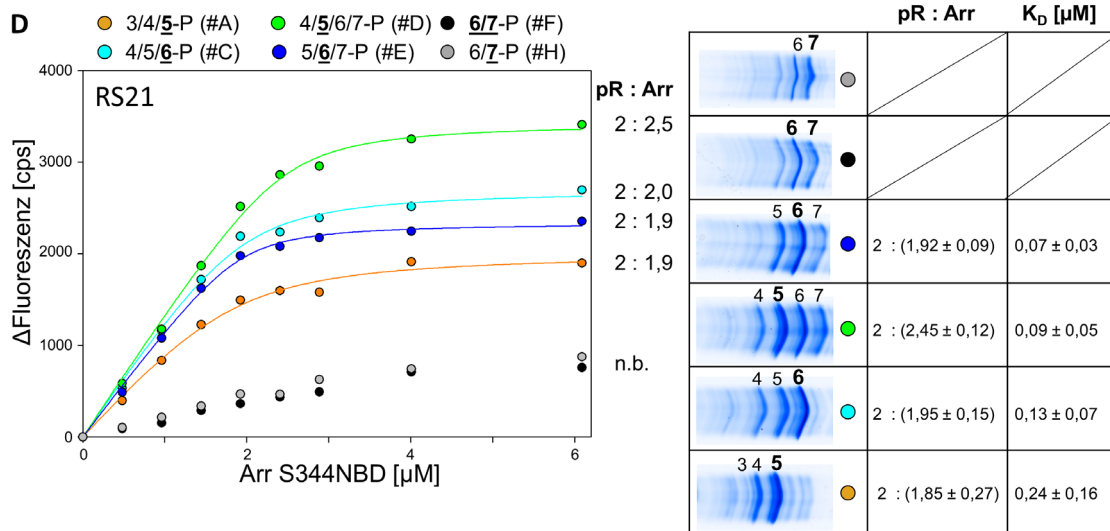


Abbildung 32: Arr S344NBD-Titration mit pRho-Spezies



**Abbildung 32 (fortgesetzt): Arr S344NBD-Titration mit pRho-Spezies**

Die Bindung von Arr S344NBD an pRho-Spezies (Aufreinigungslauf RS17 (A), RS19 (B); RS20 (C) & RS21 (D)) wurde über einen zeitbasierten Fluoreszenzanstieg gemessen. 0  $\mu$ M bis 6  $\mu$ M Arr S344NBD wurden gegen 2  $\mu$ M pRho-Spezies (siehe verschiedene Farben für Phosphorylierungsniveaus sowie IEF-Gelausschnitte rechts neben den Bindungskurven) titriert. Die Hauptphosphorylierung wurde unterstrichen/fett dargestellt. ΔFluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Signals. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität (K<sub>D</sub>) und die Bindungsstöchiometrie (n.b. für „nicht bestimmt“); die zugehörige Werte sind in den Boxen angegeben (C). Puffer- und Messbedingungen: siehe Bildunterschrift von Abbildung 30.

Schon die nächsthöhere Phosphorylierungsfraction (#G<sub>RS17</sub>, 4/5/6-P, cyanfarbene Spur), mit hauptsächlich sechs Phosphaten führt zu einem höheren Endniveau der Titrationskurve. Die Stöchiometrie steigt hierbei auf 2 : 1,2 (pRho : Arr). Die nächste Fraction mit dem nächsthöheren Phosphorylierungsniveau (#I<sub>RS17</sub>, 5/6/7-P, rote Spur) beinhaltet eine gleichmäßige Verteilung von fünf, sechs sowie sieben Phosphaten. Die Titrationskurve zeigt hierfür die größte Fluoreszenzänderung aller Einzeltitrationen mit dem höchsten Endniveau der Bindungskurve. Ebenso steigt die ermittelte Bindungsstöchiometrie auf 2 : 2,2 (pRho : Arr). Bei der Titration mit #J<sub>RS17</sub>, der nächsten eluierten Fraction (5/6/7-P, dunkelblaue Spur), fällt das Endniveau der Titrationskurve wieder knapp unter die der roten Spur von #I<sub>RS17</sub> mit 5/6/7-P, allerdings steigt die Stöchiometrie auf 2 : 2,4 (pRho : Arr). Die schwarze Spur zeigt die Titrationsergebnisse mit der Fraction mit dem höchsten Phosphorylierungsniveau: #K<sub>RS17</sub>, 6/7-P. Interessanterweise sinkt auch hier das

Endniveau der Titrationskurve wieder; ebenso fällt die Stöchiometrie auf 2 : 1,8 (pRho : Arr).

In Abbildung 32 B sind die Titrationsergebnisse mit den pRho-Spezies 3/4/5-P (#A<sub>RS19</sub>), 4/5/6-P (#B<sub>RS19</sub>), 5/6/7-P (#D<sub>RS19</sub>), 6/7-P (#F<sub>RS19</sub>) sowie 6/7-P (#G<sub>RS19</sub>) aus RS19 dargestellt. Mit steigendem Phosphorylierungsniveau steigen auch hier, ähnlich wie mit den pRho-Spezies aus RS17, die Endniveaus der Titrationskurven sowie die ermittelten Bindungsstöchiometrie erst von etwa 2 : 1,2 auf 2 : 2,0 (pRho : Arr), bis sie dann wieder auf 2 : (1,8 bis 1,7) wieder sinken (rote & schwarze Spur). Bei der am höchsten phosphorylierten pRho-Spezies #G<sub>RS19</sub> (6/7-P; graue Spur) fällt das Endniveau der Bindungskurve weit unterhalb der am niedrigsten phosphorylierten pRho-Spezies #A<sub>RS19</sub> (3/4/5-P, orangene Spur). Vergleicht man dieses Ergebnis mit den erhaltenen Bindungsstöchiometrien der pRho-Spezies aus RS20 (Abbildung 32 C), so ist eine ähnliche Entwicklung erkennbar. Allerdings steigt das Endniveau der Titrationskurve von #A<sub>RS20</sub> (3/4/5-P, orangene Spur) nur geringfügig, bis sie das maximale Endniveau von 4/5/6/7-P (#C<sub>RS20</sub>, grüne Spur) erreicht. Danach sinkt das Endniveau wieder. Auch die gemessenen Bindungsstöchiometrien steigen von etwa 2 : 2,0 auf 2 : (2,1 bis 2,3) an und sinken dann nur leicht auf 2 : (1,8 bis 2,2) (pRho : Arr). Auffällig ist, dass auch hier die Endniveaus der Titrationskurven der am höchsten phosphorylierten pRho-Spezies mit 6/7-P (#G<sub>RS20</sub>, graue Spur) wieder weit gesunken sind und keine Bindungskurve berechnet werden kann. Abbildung 32 D bestätigt mit den Ergebnissen der pRho-Spezies aus RS21 den vorher beschriebenen Trend: Das Endniveau der Bindungskurve steigt von niedrig phosphoryliertem #A<sub>RS21</sub> (3/4/5-P, orangene Spur) auf fast das Doppelte bei der grünen Spur für #D<sub>RS21</sub> (4/5/6/7-P) an. Gleichzeitig steigt die Bindungsstöchiometrie von 2 : 1,9 auf 2 : 2,5 (pRho : Arr) an. Mit steigendem Phosphorylierungsgrad fallen Endniveau der Kurve sowie Bindungsstöchiometrie, letztere auf 2 : 1,9 (pRho : Arr). Für die am höchsten phosphorylierten pRho-Spezies #F<sub>RS21</sub> (6/7-P, schwarze Spur) sowie #G<sub>RS21</sub> (6/7-P, graue Spur), fällt das Endniveau der Kurve auf das 0,5-fache des orangenen Endniveaus mit dem niedrigsten Phosphorylierungsniveau. Für diese beiden pRho-Spezies konnte die Bindungsstöchiometrie nicht bestimmt werden. Obwohl die IEF-Phosphorylierungsanalyse der untersuchten Fraktionen die gleiche Bandenzusammensetzung ergibt, zeigen sie erhebliche Unterschiede in den Bindungsstöchiometrien (Abbildung 32 A bis D). Wie

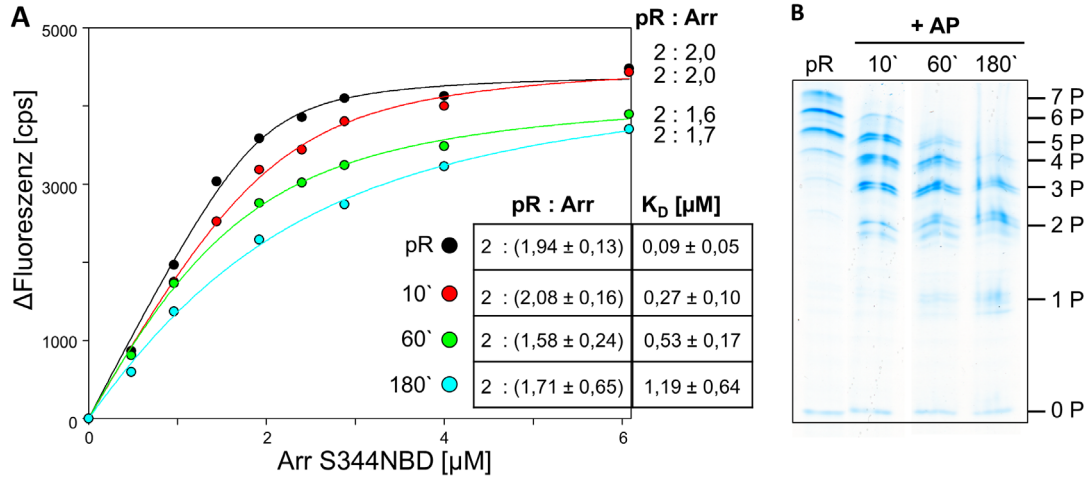
oben beschrieben ist durch die Variabilität der Endniveaus der Titrationskurven der Fraktionen mit gleicher Bandenzusammensetzung auch hier ein Zusammenfassen vergleichbarer Fraktionen verschiedener RS-Läufe nicht sinnvoll (siehe Diskussion).

## **2.4.5 Arrestintitrationen nach Rezeptordephosphorylierung**

### **2.4.5.1 Arr 344NBD-Titration mit dephosphoryliertem Rho**

Eine Frage, die sich aus den vorausgegangenen Arrestintitrationen ergab, ist, wieso das Endniveau der Titrationskurven wieder sinkt (siehe Abbildung 30 bis Abbildung 32 ab Seite 62), wenn der Rezeptor-C-Terminus des Rhodopsins mehr als sechs Phosphate hat. Um diese Zusammenhänge zu analysieren, wurden Funktionsgewinn-Experimente (*gain-of-function-experiments*) durchgeführt, bei denen die hochphosphorylierte Rezeptorprobe erst dephosphoryliert und anschließend die Arrestinbindung untersucht wurde. Da die RS-Läufe nur eine sehr kleine Menge der hochphosphorylierten 6/7-P-Proben lieferten (siehe Tabelle 12 bis Tabelle 15 im Anhang ab Seite 151), wurden die Vorversuche zu den Phosphatasebedingungen in Detergens/Phospholipid-Puffer mit gereinigten, aber unaufgetrennten, hochphosphorylierten Rho-Proben durchgeführt (siehe dazu auch Abbildung 17 auf Seite 41). Unter den zuvor bestimmten Dephosphorylierungsbedingungen (0,4 U Alkalische Phosphatase (AP), 30 °C) wurde hochphosphoryliertes Rhodopsin zehn Minuten, 60 Minuten und 180 Minuten dephosphoryliert (Abbildung 33 B). Die Abnahme der Phosphorylierung ist anhand der allmählich verschwindenden IEF-Gelbanden erkennbar. Bereits zehn Minuten nach Dephosphorylierungsbeginn verschwindet die obere Bande, welche siebenfach phosphoryliertes Rhodopsin darstellt; auch 6 P ist sehr reduziert, wohingegen die niedrigeren Anzahlen (2 P bis 5 P) zunehmen. Nach 60 Minuten Dephosphorylierung liegt das Rhodopsin nur noch maximal fünffach phosphoryliert vor, bis es nach 180 Minuten nur noch ein- bis dreifach phosphoryliert ist. Mit sinkendem Phosphorylierungsgrad nimmt auch die Bindung von Arrestin ab (Abbildung 33 A). So hat unaufgetrenntes, gereinigtes, hochphosphoryliertes Rhodopsin (mit hauptsächlich fünf- bis siebenfach phosphoryliertem C-Terminus) eine Bindungsstöchiometrie von etwa 1: 1 (pRho : Arr). Mit sinkendem Phosphorylierungsgrad sinkt auch die ermittelte

Bindungsstöchiometrie auf 2 : 1,7 bis 1,6 (pRho : Arr). Dieses Ergebnis zeigt, dass eine Dephosphorylierung im Detergens/Phospholipid-Puffer möglich ist.



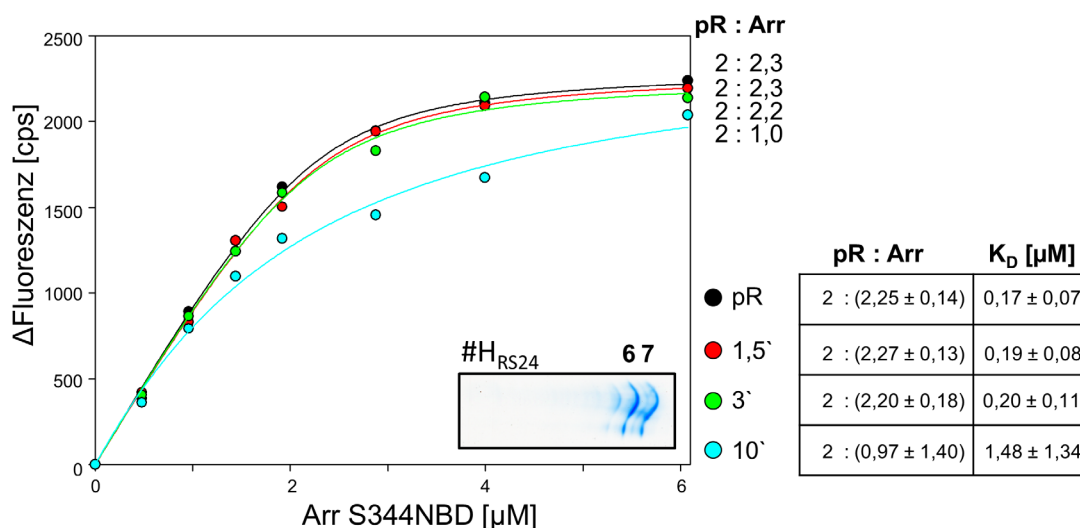
**Abbildung 33: Arr S344NBD-Titration mit pRho nach Dephosphorylierung**

(A) Die Bindung von Arr S344NBD an pRho nach Dephosphorylierung durch die Alkalische Phosphatase (AP) wurde über einen zeitbasierten Fluoreszenzanstieg gemessen. 0 μM bis 6 μM Arr S344NBD wurden gegen 2 μM pRho<sub>dephospho</sub> titriert. Die jeweilige Dauer der Dephosphorylierung ist farblich dargestellt: nicht dephosphoryliert (schwarz); 10 min (rot); 60 min (grün); 180 min (cyanfarben). ΔFluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Signals. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität ( $K_D$ ) und die Bindungsstöchiometrie; die zugehörigen Werte sind in den Boxen angegeben. Puffer- und Messbedingungen: siehe Bildunterschrift von Abbildung 30. (B) IEF-Gel der verwendeten pRho-Proben. Die einzelnen Banden wurden der jeweiligen Anzahl der Phosphate (P) zugeordnet (rechts).

Um eine für die Dephosphorylierungsexperimente ausreichende Menge an sechs- bzw. siebenfach phosphoryliertem Rhodopsin zu erhalten, wurden 12 mg hochphosphoryliertes pRho aufgetrennt (RS24; siehe Abbildung 48 auf Seite 149 und Tabelle 14 auf Seite 152). #H<sub>RS24</sub> ist die Fraktion mit dem höchsten Phosphorylierungsgrad (6/7-P). Die Ausbeute (630 μg) war ausreichend für Dephosphorylierung, Umpufferung und Messung der Konzentration mit anschließender Arr S344NBD-Titration; IEF-Gele der Dephosphorylierungsproben konnten aber aufgrund des hohen Materialbedarfs nicht durchgeführt werden. Die Dephosphorylierungsbedingungen wurden aus den Vorversuchen übernommen

(siehe Abbildung 33). Um schon kleine Änderungen der Phosphorylierungszusammensetzung abzubilden, wurde die Inkubation mit Alkalischer Phosphatase auf 1,5 Minuten, drei Minuten sowie zehn Minuten verkürzt.

Abbildung 34 zeigt die Ergebnisse der zeitbasierten Fluoreszenztitration mit Arrsetin S344NBD und den verschiedenen dephosphorylierten #H<sub>RS24</sub> (6/7-P)-Proben. Die schwarze Spur stellt zur Kontrolle die Ausgangssituation mit nichtdephosphoryliertem #H<sub>RS24</sub> (6/7-P) und einer Bindungsstöchiometrie von etwa 2 : 2,3 (pRho : Arr) dar. Eine Dephosphorylierung für 1,5 Minuten bzw. drei Minuten durch die AP brachte allerdings keine Änderung des Endniveaus der Titration oder der Bindungsstöchiometrie. Erst nach zehn Minuten Dephosphorylierung der #H<sub>RS24</sub> (6/7-P)-Probe sank die Bindungsstöchiometrie auf etwa 2 : (1 ± 1,4) (pRho : Arr).



**Abbildung 34: Arr S344NBD-Titration mit dephosphorylierten 6/7-P-Proben**

(A) Die Bindung von Arr S344NBD an die pRho-Spezies aus Fraktion #H<sub>RS24</sub> (6/7-P) nach Dephosphorylierung durch die Alkalische Phosphatase (AP) für verschiedene Zeitpunkte wurde über einen zeitbasierten Fluoreszenzanstieg gemessen. 0 μM bis 6 μM Arr S344NBD wurden gegen 2 μM #H<sub>RS24</sub> (6/7-P)<sub>dephospho</sub> (siehe verschiedene Farben für die jeweiligen Zeitpunkte der Dephosphorylierung: schwarz: nicht dephosphoryliert (Kontrolle); rot: 1,5 min; grün: 3 min; cyanfarben: 10 min) titriert. ΔFluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Signals. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität (K<sub>D</sub>) und die Bindungsstöchiometrie; die zugehörigen Werte sind in den Boxen angegeben. Puffer- und Messbedingungen: siehe Bildunterschrift von Abbildung 30. Die IEF-Kontrollgelbande von #H<sub>RS24</sub> (6/7-P) vor pRho-Dephosphorylierung ist als Box im Spektrum dargestellt. AP-Einsatz: 0,4 U bei 30 °C.

### 2.4.6 Zusammenfassung der Titrationsergebnisse mit pRho-Spezies

Ein Überblick über alle fluoreszenzbasierten Titrationsergebnisse mit den verschiedenen Arrestinmutanten und den gereinigten, aufgetrennten pRho-Spezies in DOPA/DDM ist in der folgenden Tabelle 3 aufgeführt.

**Tabelle 3:** Titrationsergebnisse mit pRho-Spezies

3/4/ <u>5</u> -P						
Arr I72NBD			Arr I299B/L173W		Arr S344NBD	
RS	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.
17 #D	n.d.	-	n.d.	-	2 : (0,53 ± 0,74)	32 A
17 #E	n.d.	-	n.d.	31 B	n.d.	-
17 #F	n.d.	-	n.d.	-	2 : (0,74 ± 1,10)	32 A
19 #A	2 : (1,18 ± 0,07)	30 C	n.d.	-	2 : (1,16 ± 0,10)	32 B
20 #A	2 : (1,25 ± 0,08)	30 D	2 : (1,48 ± 0,21)	31 C	2 : (1,99 ± 0,32)	32 C
21 #B	2 : (1,10 ± 0,10)	30 A	2 : (1,69 ± 0,45)	31 D	2 : (1,85 ± 0,27)	32 D
25 #A	n.d.	-	2 : (2,71 ± 0,25)	51 A	2 : (1,32 ± 0,30)	52 A
			2 : (1,31 ± 0,49)	51 B	2 : (0,74 ± 2,11)	52 B
25 #B	n.d.	-	2 : (0,24 ± 0,68)	51 A	2 : (2,04 ± 0,12)	52 A
			2 : (0,26 ± 0,69)	51 B	2 : (2,06 ± 0,13)	52 B

4/5/ <u>6</u> -P						
Arr I72NBD			Arr I299B/L173W		Arr S344NBD	
RS	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.
17 #G	2 : (1,14 ± 0,06)	30 B	2 : (0,94 ± 0,21) 2 : (1,09 ± 0,14)	31 A 31 B	2 : (1,23 ± 0,06)	32 A
19 #B	2 : (1,92 ± 0,06)	30 C	n.d.	-	2 : (2,02 ± 0,11)	32 B
20 #B	2 : (1,58 ± 0,07)	30 D	2 : (1,29 ± 0,23)	31 C	2 : (1,96 ± 0,07)	32 C
21 #C	2 : (1,40 ± 0,20)	30 A	2 : (1,60 ± 0,05)	31 D	2 : (1,95 ± 0,15)	32 D
25 #C	n.d.	-	2 : (1,10 ± 0,15)	51 A	2 : (2,27 ± 0,08)	52 A
			2 : (1,45 ± 0,12)	51 B	2 : (2,29 ± 0,08)	52 B

4/ <u>5</u> /6/7-P						
Arr I72NBD			Arr I299B/L173W		Arr S344NBD	
RS	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.
17 #H	2 : (1,31 ± 0,04)	30 B	2 : (1,17 ± 0,15)	31 A	n.d.	-
19 #C	2 : (1,78 ± 0,10)	30 C	n.d.	-	n.d.	-
20 #C	2 : (1,37 ± 0,06)	30 D	2 : (1,16 ± 0,25)	31 C	2 : (2,14 ± 0,21)	32 C
21 #D	2 : (1,83 ± 0,05)	30 A	2 : (1,61 ± 0,23)	31 D	2 : (2,45 ± 0,12)	32 D
25 #D	n.d.	-	2 : (1,28 ± 0,11)	51 A	2 : (2,24 ± 0,06)	52 A
			2 : (1,23 ± 0,12)	51 B	2 : (2,21 ± 0,11)	52 B

<u>5</u> /6/7-P						
Arr I72NBD			Arr I299B/L173W		Arr S344NBD	
RS	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.
17 #I	n.d.	-	2 : (1,61 ± 0,13) 2 : (2,33 ± 0,07)	31 A 31 B	2 : (2,20 ± 0,24)	32 A
19 #D	n.d.	-	n.d.	-	2 : (1,80 ± 0,08)	32 B
20 #D	n.d.	-	n.d.	-	2 : (1,79 ± 0,81)	32 C
21 #D	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
25 #E	n.d.	-	2 : (1,30 ± 0,22)	51 A	2 : (2,05 ± 0,17)	52 A
			2 : (1,05 ± 0,13)	51 B	2 : (2,33 ± 0,12)	52 B



<u>5/6/7-P</u>						
Arr I72NBD			Arr I299B/L173W		Arr S344NBD	
RS	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.
17 #J	2 : (1,68 ± 0,10)	30 B	2 : (1,14 ± 0,16)	31 A	2 : (2,39 ± 0,10)	32 A
19 #E	2 : (1,96 ± 0,20)	30 C	n.d.	-	n.d.	-
20 #E	2 : (1,37 ± 0,21)	30 D	2 : (1,29 ± 0,23)	31 C	2 : (2,26 ± 0,07)	32 C
21 #E	2 : (1,43 ± 0,09)	30 A	2 : (1,30 ± 0,11)	31 D	2 : (1,92 ± 0,09)	32 D
25 #F	n.d.	-	2 : (1,04 ± 0,18) 2 : (1,29 ± 0,23)	51 A 51 B	2 : (2,07 ± 0,08) 2 : (2,29 ± 0,08)	52 A 52 B
<u>6/7-P</u>						
Arr I72NBD			Arr I299B/L173W		Arr S344NBD	
RS	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.
17 #K	n.d.	-	2 : (0,83 ± 0,21) 2 : (1,80 ± 0,10)	31 A 31 B	2 : (1,76 ± 0,06)	32 A
19 #F	n.d.	-	n.d.	-	2 : (1,66 ± 0,10)	32 B
20 #F	n.d.	-	2 : (2,10 ± 1,10)	31 C	2 : (2,22 ± 0,17)	32 C
21 #G	2 : (1,15 ± 0,21)	30 A	n.d.	-	n.d.	32 D
25 #G	n.d.	-	2 : (1,10 ± 0,28) 2 : (1,03 ± 0,25)	51 A 51 B	2 : (1,99 ± 0,19) 2 : (2,76 ± 0,13)	52 A 52 B
<u>6/7-P</u>						
Arr I72NBD			Arr I299B/L173W		Arr S344NBD	
RS	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.	pRho : Arr	Abb.
17 #L	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	-
19 #G	n.d.	-	n.d.	-	2 : (3,09 ± 0,20)	32 B
20 #F	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	32 C
21 #H	n.d.	-	n.d.	-	n.d.	32 D
25 #H	n.d.	-	2 : (1,46 ± 0,14) 2 : (1,32 ± 0,17)	51 A 51 B	2 : (2,23 ± 0,12) 2 : (2,77 ± 0,14)	52 A 52 B
Abkürzung in der Tabelle						
n.d. nicht in dieser Abbildung dargestellt/gemessen						

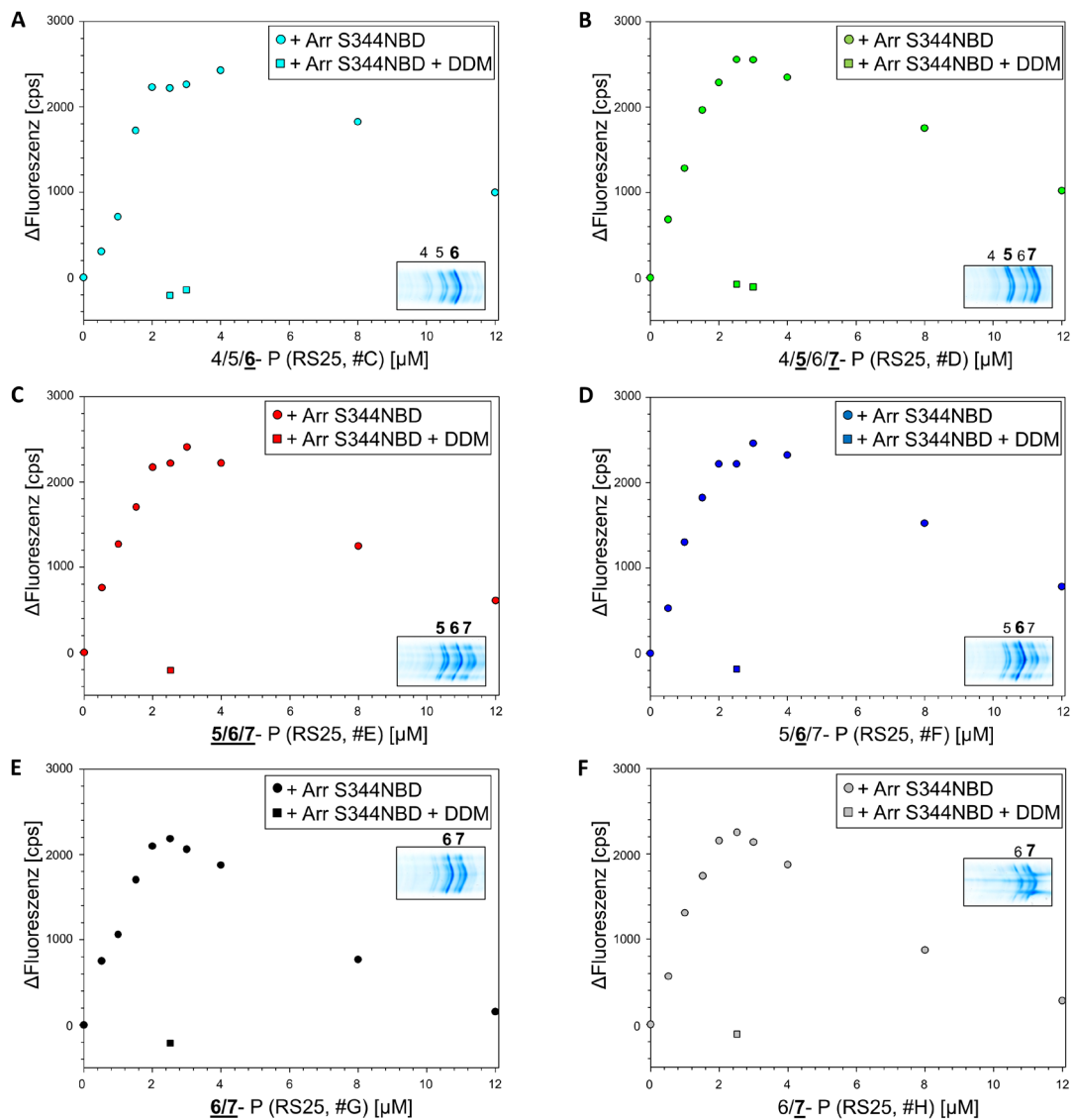
Die Fraktionen der RS-Läufe mussten für die IEF-Analyse und Fluoreszenzmessungen aufkonzentriert werden, wodurch sich der DDM-Gehalt der Proben erhöht. Da hohe DDM-Konzentrationen die Arrestinbindung an pRho inhibieren, wurde der maximale DDM-Gehalt nach Umpufferung und Aufkonzentrierung der einzelnen Proben errechnet. Daraus wurde dann die maximal mögliche DDM-Endkonzentration der einzelnen pRho-Spezies in den Arrestintitrationsen ermittelt. Die Ergebnisse hierfür sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Maximal mögliche prozentuale DDM-Endkonzentration der pRho-Spezies in den Fluoreszenzmessungen der Arrestintitrationen

RS		3/4/ <u>5</u> -P	4/5/ <u>6</u> -P	4/ <u>5</u> /6/7-P	<u>5</u> /6/ <u>7</u> -P	5/ <u>6</u> /7-P	<u>6</u> /7-P	6/ <u>7</u> -P
17	Fraktion	F	G	H	I	J	K	L
	DDM	0,10 %	0,12 %	0,13 %	0,13 %	0,14 %	0,14 %	0,20 %
19	Fraktion	A	B	C	D	E	F	G/ H
	DDM	0,11 %	0,12 %	0,13 %	0,14 %	0,13 %	0,16 %	0,20 %
20	Fraktion	A	B	C	D	E	F	G/ H
	DDM	0,14 %	0,14 %	0,14 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %
21	Fraktion	A/B	C	D	E	F	G	H/I
	DDM	0,15 %	0,14 %	0,11 %	0,15 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %
22	Fraktion	A	B	C/D	E	F	G	H
	DDM	0,12 %	0,12 %	0,14 %	0,16 %	0,20 %	0,20 %	0,20 %
23	Fraktion	C	D	E/F	-	G	H	-
	DDM	0,11 %	0,12 %	0,13 %	-	0,15 %	0,16 %	-
24	Fraktion	C/D	E	F	-	G	H	-
	DDM	0,15 %	0,13 %	0,12 %	-	0,16 %	0,13 %	-
25	Fraktion	A/B	C	D	E	F	G	H
	DDM	0,14 %	0,11 %	0,11 %	0,12 %	0,11 %	0,12 %	0,11 %

#### 2.4.7 Rezeptortitrationen

Um die Auswirkung der verschiedenen Phosphorylierungsgrade innerhalb des C-Terminus‘ des Rhodopsins auf die Arrestinbindung zu untersuchen, wurden auch Rezeptortitrationen (0  $\mu$ M bis 12  $\mu$ M pRho-Spezies) als ortsspezifische Fluoreszenzexperimente mit 2  $\mu$ M der Arrestinmutante der 344-Schleife der C-Domäne, Arr S344NBD, durchgeführt. Ausgangsmaterial der pRho-Spezies bildeten die aufgetrennten Fraktionen des RS-Laufes #25 (siehe Abbildung 49 auf Seite 150). Die Ergebnisse der Titrationen sind in Abbildung 35 sowie in Abbildung 56 auf Seite 159 dargestellt.



**Abbildung 35: Rezeptortitration mit Arr S344NBD**

Die Bindung von Arr S344NBD an pRho-Spezies (aus RS25, A: 4/5/**6**-P #C<sub>RS25</sub>; B, 4/5/6/7-P #D<sub>RS25</sub>; C, 5/6/7-P #E<sub>RS25</sub>; D, 5/6/7-P #F<sub>RS25</sub>; E, 6/7-P #G<sub>RS25</sub>; F, 6/7-P #H<sub>RS25</sub>) wurde über einen zeitbasierten Fluoreszenzanstieg gemessen. 0  $\mu\text{M}$  bis 12  $\mu\text{M}$  der jeweiligen pRho-Spezies wurden gegen 2  $\mu\text{M}$  Arr S344NBD (Kreise) titriert. Die Quadrate kennzeichnen Messungen, bei denen zusätzlich die DDM-Menge zugegeben wurde, die maximal bei 12  $\mu\text{M}$  pRho enthalten sein könnte. Die Hauptphosphorylierung wurde unterstrichen/fett dargestellt. IEF-Gelausschnitte sind in Boxen dargestellt.  $\Delta\text{Fluoreszenz}$  entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Signals. Puffer- und Messbedingungen: siehe Bildunterschrift von Abbildung 30 auf Seite 62.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei höheren Rezeptorkonzentrationen (ab etwa 4  $\mu\text{M}$  pRho) die Arrestinbindung wieder abnimmt. Grund für diese Abnahme ist vermutlich die Inhibition der Arrestinbindung durch die hohe DDM-Konzentration, die durch endogenes DDM bei Zugabe von großen Volumina der pRho-Probe entsteht. Diese Vermutung wird durch Messungen mit 2,5  $\mu\text{M}$  bzw. 3  $\mu\text{M}$  pRho, bei denen zusätzlich DDM zugesetzt wurde, unterstützt: Bei einer DDM-Konzentration, welche bei 12  $\mu\text{M}$  pRho nach Aufkonzentration und Umpufferung maximal in der Probe enthalten sein könnte, ist keine Fluoreszenzänderung mehr messbar. Eine Auswertung der Titrations hinsichtlich der Bindungsstöchiometrie konnte daher nicht erfolgen.

### 3 Diskussion

Die ersten drei Abschnitte der Diskussion orientieren sich an den drei Zielen der Arbeit, namentlich: (i) die quantitative Bestimmung der Rhodopsin-Phosphorylierung via IEF, (ii) die Isolierung unterschiedlich phosphorylierter Rho-Spezies und (iii) die Untersuchung des Einflusses der Rezeptorphosphorylierung auf die Interaktion von Arrestin mit dem phosphorylierten Rezeptor (pRho). In den nachfolgenden Abschnitten werden die Ursachen der Variabilität der Arrestintitrationen, mögliche Arrestin-pRho-Bindungsmechanismen sowie die physiologische Rolle der unterschiedlichen Bindungsstöchiometrien diskutiert.

#### 3.1 Quantifizierung der Rhodopsinphosphorylierung durch IEF

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) ermöglicht eine quantitative Analyse der Phosphorylierungsverteilung innerhalb der Rezeptorproben. Die IEF-Methode wurde bereits mehrfach für die Analyse der Rhodopsinphosphorylierung verwendet (u.a. in Adamus et al., 1988; McDowell et al., 1993; Adamus et al., 1993; McDowell et al., 2000). Die Methode musste jedoch aufgrund von technischen Änderungen der bei der IEF genutzten Gele und Materialien für diese Arbeit zunächst neu etabliert werden. Es stellte sich heraus, dass der Schlüssel zur IEF-Auftrennung in der vollständigen Delipidisierung des Rhodopsins liegt, welche abhängig vom verwendeten Detergens ist und über einen Zwischenschritt mit OG erreicht werden kann. Die einzelnen Banden in den IEF-Gelen zeigen die in der Präparation vorhandenen pRho-Spezies. Die Trennung erfolgt hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Phosphorylierungsanzahl und kann anhand des sinkenden isoelektrischen Punkts (IP) den bis zu sieben Phosphorylierungen zusätzlich zum unphosphorylierten Rezeptor zugeordnet werden. Die Zuordnung der Banden passt zu den veröffentlichten Werten (McDowell et al., 1993; 2000; vgl. Tabelle 5 auf Seite 80).

Die in der Literatur beschriebenen IEF-Auftrennungen beschränken sich meist auf null bis fünf Phosphate (Adamus et al., 1988; McDowell et al., 1993; Adamus et al., 1993; McDowell et al., 2000). Zusätzlich konnten in dieser Arbeit auch die pRho-Spezies mit sechs sowie mit sieben Phosphaten aufgetrennt werden. Über Western-Blot sowie enzymatischer Dephosphorylierung der zuvor phosphorylierten Rhodopsinproben war es

möglich, das Trennergebnis der IEF zu bestätigen (siehe auch Abbildung 16 und Abbildung 17 auf den Seiten 39 bis 41) und zu zeigen, dass die unterschiedlichen Banden im IEF-Gel, die im Bereich des IPs von 6,0 bis 4,0 auftreten, tatsächlich die einzelnen pRho-Spezies abbilden und somit dem oben beschriebenen Phosphorylierungsgrad der Rezeptorprobe zugeordnet werden können.

**Tabelle 5:** IP-Zuordnungen der pRho-Spezies

Phosphatanzahl	Eigene IP-Werte <sup>a</sup>	IP-Werte der Literatur <sup>c</sup>
0 P	~5,85 ~5,60–5,50 <sup>b</sup>	5,85 5,60–5,50
1 P	~5,40	5,33
2 P	~5,00	4,96
3 P	~4,70	4,82
4 P	~4,66	4,66
5 P	~4,50	4,55 <sup>d</sup>
6 P	~4,35	—
7 P	~4,25	—

<sup>a</sup> Die IP-Zuordnung erfolgte über die Bandenverteilung des Standards und stellt einen Durchschnitt der IP-Werte aller durchgeführten IEFs dar; die Auftrennung kann geringfügig schwanken, je nachdem, welcher Ampholytmix zum Äquilibrieren des IEF-Gels genutzt wurde (d.h. IP 3 bis 7 oder IP 4 bis 7) und wie die Elektrodendochte auf dem Gel platziert wurden.

<sup>b</sup> Nebenbande < 1 %

<sup>c</sup> McDowell et al., 1993: 0 P bis 4 P

<sup>d</sup> McDowell et al., 2000: 0 P bis 5 P

0 P-Rhodopsin hat eine Hauptbande bei IP = 6,0 und eine schwache Nebenbande im Bereich von IP ~5,60 bis 5,50. Nach Proteolyse mit Asp-N verlagert sich die Hauptbande in den Bereich von IP ~7,4 bis 6,9 und teilt sich in zwei Banden, welche dem trunktierten Rhodopsin entsprechen, je nachdem, ob nach dem ersten Asp- oder zweiten Asp-Rest im C-Terminus geschnitten wurde (siehe Abbildung 45 C auf Seite 147). Sämtliche Banden unterhalb von IP = 6,0 verschwinden durch das proteolytische Entfernen des C-Terminus‘ des Rezeptors, was zeigt, dass diese Banden nur für Phosphorylierungen innerhalb des Rezeptor-C-Terminus‘ stehen. Die Bandenverteilung der aufgetrennten phosphorylierten Rezeptorproben zeigt zudem nie mehr als sieben Phosphate, was der Anzahl der potenziellen Phosphorylierungsstellen im bovinen Rezeptor-C-Terminus entspricht. Es

ist daher davon auszugehen, dass (im Gegensatz zu frühen Veröffentlichungen von Wil- den & Kühn (1982), bei denen mehr als sieben Phosphorylierungen gefunden wurden) keine Phosphorylierung außerhalb des C-Terminus‘ erfolgt.

Wie zu erwarten, zeigt die IEF von pRho aus unterschiedlichen Präparationen, die sich in der Inkubationszeit mit der endogenen Rhodopsinkinase unterscheiden (vgl. 2.1.1 ab Seite 34), deutliche Unterschiede im Phosphorylierungsgrad (siehe Abbildung 15 auf Seite 38). Eine zehnminütige Belichtungszeit ergibt Rezeptor-Präparationen mit einer Mi- schung aus 0 P bis 4 P, geringfügig sogar bis zu 5 P (mediumP, Abbildung 15). Rhodop- sin-Präparationen, die zwei Stunden (Sättigung) belichtet werden (hochP, Abbildung 15), enthalten dagegen bevorzugt 4 P bis 7 P und nur einen kleinen Anteil gering phosphory- lierter (0 P bis 3 P) Rezeptoren. Allerdings zeigen diese Rezeptorpräparationen trotz glei- cher Belichtungszeit deutliche Schwankungen der Phosphorylierungsverteilung und -menge, insbesondere ab dem fünften Phosphatrest. Diese Schwankungen sind wahr- scheinlich auf den variablen Gehalt an aktiver Rhodopsinkinase in den Präparationen zu- rückzuführen; eine Variabilität der enzymatischen Aktivität könnte z.B. durch die unter- schiedliche Transportdauer des Augenmaterials verursacht werden.

Der variable Phosphorylierungsgrad der hochphosphorylierten Rhodopsin-Präparationen zeigt auch den Vorteil der IEF-Methode gegenüber der funktionellen Charakterisierung über Extra Meta II-Messungen mit Arrestin. Mit letzteren kann nur der prozentuale Anteil nicht bzw. gering phosphorylierter Rezeptoren ermittelt werden, da diese kein Arrestin-1 binden können; Rezeptoren mit mehr als drei Phosphaten können nicht über eine Meta II-Stabilisierung unterschieden werden.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Arbeit ist, dass Rhodopsinproben, die nicht nachträglich phosphoryliert werden, dennoch geringe, aber meist signifikante Mengen von ein bis zwei Phosphatresten (siehe Abbildung 15 auf Seite 38) enthalten. Somit wurde gezeigt, dass ursprünglich als „unphosphoryliert“ (nonP) bezeichnete Rhodopsin-Präparationen nicht durchgehend einheitlich unphosphoryliert vorliegen. Dies ist vermutlich darauf zurück- zuführen, dass nach Schlachtung der Kuh und Entnahme der Augen (beide Prozesse lau- fen unter normaler Beleuchtung ab), keine komplette Dunkeladaptation und Dephospho- rylierung beim anschließenden Transport und der Präparation der Retinae im Dunkeln erfolgen konnte. Dieses Ergebnis wirft insbesondere die Frage auf, ob die Behauptung,

dass Arrestin auch an „unphosphoryliertes“ Rhodopsin bindet, wie es in der Literatur bereits mehrfach beschrieben wurde (Vishnivetskiy et al., 1999; zusammengefasst in Gurevich & Gurevich, 2004), tatsächlich stimmt. In all diesen Experimenten wurde die Phosphorylierung ausschließlich mittels radioaktivem ATP quantifiziert, sodass zuvor endogen phosphoryliertes Rhodopsin nicht detektiert werden konnte. Eine IEF-Analyse, die auch endogen phosphoryliertes Rhodopsin aufzeigen würde, wurde in diesen Versuchen nicht durchgeführt.

### **3.2 Präparative Trennung der unterschiedlichen pRho-Spezies**

Um Rhodopsin-Spezies mit verschiedenen Phosphorylierungsgraden präparativ zu trennen, wurde bisher die Methode der Chromatofokussierung verwendet (McDowell et al., 1993; McDowell et al., 2000; Slyterman & Elgerson, 1978; Slyterman & Wijdenes, 1977, 1978 & 1981). In dieser Arbeit konnte diese Methode jedoch nicht durchgeführt werden, da der dafür von der Firma Pharmacia entwickelte Polypuffer 74 ersatzlos aus der Produktion genommen wurde und es daher nicht möglich war, die Zusammensetzung dieser Pufferlösung ausfindig zu machen. Somit war die Etablierung der quantitativen Trennung der pRho-Spezies ein wesentlicher Teil dieser Arbeit. Es wurden u.a. verschiedene alternative Puffersysteme verwendet (siehe 2.3 ab Seite 41), um den für die Ausbildung des pH-Gradienten benötigten Polypuffer 74 zu ersetzen; diese brachten jedoch nicht den gewünschten Trenneffekt. Letztendlich wurde ein optimales Trennergebnis mit einer Mono P-Säule (für die Chromatofokussierung entwickelter Anionenaustauscher) und einer Elution mit einem Salzgradient von 0 M bis 1 M NaCl bei einem pH-Wert von 7 erhalten (siehe 2.3 ab Seite 41, 6.3.2 ab Seite 148 und Abbildung 46 auf Seite 148).

Alle chromatographischen Rhodopsin-Spezies-Separationen („RS-Läufe“) mit hochphosphorylierten Rhodopsin-Präparationen (2 h Belichtung bei der Präparation) weisen ein vergleichbares Elutionsprofil auf (vgl. Abbildung 19 auf Seite 44, Abbildung 47 bis Abbildung 49 ab Seite 149). Die pRho-Spezies-Mischungen der einzelnen Fraktionen gleichen sich in ihrer Hauptphosphorylierung und unterscheiden sich lediglich in der prozentualen Phosphorylierungszusammensetzung (vgl. dafür Tabelle 1 auf Seite 45 sowie Tabelle 12 bis Tabelle 15 ab Seite 151). Generell zeigt sich, dass mit einer zunehmenden



Ionenstärke pRho-Spezies mit zunehmenden Phosphorylierungsgrad eluiert werden. Auffällig ist allerdings, dass phosphoryliertes Rhodopsin zwar in klar getrennten UV-Absorptionspeaks von der Säule eluiert, diese Elutionspeaks jedoch aus Mischungen von pRho-Spezies unterschiedlicher Phosphorylierungsgrade bestehen. In RS17 ist zum Beispiel die pRho-Spezies 5 P in sechs unterschiedlichen Fraktionen (#E bis #J) enthalten. In den früh eluierten Fraktionen #E und #F liegt der Rezeptor fast ausschließlich fünffach phosphoryliert vor, wohingegen in darauffolgenden Fraktionen #G bis #J der fünffach phosphorylierte C-Terminus zusammen mit den sechs- und siebenfach phosphorylierten Rezeptoren in unterschiedlichen Verhältnissen vorliegt. Man kann also mutmaßen, dass die jeweilige fünffach phosphorylierte Rho-Spezies Unterschiede in der Position dieser Phosphate innerhalb des C-Terminus aufweist und diese Unterschiede die Elution von der MonoP-Säule beeinflussen. Um die Phosphorylierungsstellen im C-Terminus der Rezeptorproben zu ermitteln, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Proben mittels Massenspektrometrie (Institut für Biochemie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) analysiert. Die massenspektrometrischen Untersuchungen brachten jedoch bisher keine Ergebnisse, da nicht mehr als zwei Phosphate nachweisbar waren, sodass leider keine Zuordnung der Fraktionen der RS-Läufe zur Position der Phosphorylierung erfolgen konnte. Damit bleibt die Frage offen, inwiefern sich z.B. die unterschiedlich eluierten pRho-Spezies mit fünf Phosphaten unterscheiden.

Während bei McDowell und Kollegen (2000) hauptsächlich mono- bis tetraphosphoryliertes Rhodopsin über den pH-Gradienten isoliert wurde, waren Vishnivetskiy und Kollegen in der Lage, auch höher phosphorylierte pRho-Spezies mittels Chromatofokussierung zu isolieren. Ihre Trennung führte zu insgesamt 18 verschiedenen Fraktionen, die alle ebenfalls Rhodopsin-Spezies mit heterogener Phosphorylierung enthalten. Interessanterweise zeigen diese mit einem pH-Gradienten eluierten Fraktionen eine sehr ähnliche Phosphorylierungsverteilung wie die in dieser Arbeit mit einem Salzgradienten erhaltenen Fraktionen. Ein Vergleich der Elutionsprofile ist leider nicht möglich, da diese in der Veröffentlichung nicht gezeigt sind. Vishnivetskiy und Kollegen konnten als höchstphosphorylierte pRho-Spezies-Fraktionen mit 5/6/7-P<sup>5</sup>) sowie 5/6/7-P<sup>5</sup>) isolieren

---

<sup>5</sup>) Zur Benennung der jeweiligen pRho-Spezies wurden die in der Mischung enthaltenen Phosphatreste (P) angegeben, wobei die jeweils dominierende Phosphorylierungsanzahl hervorgehoben ist (siehe auch Tabelle 1 auf Seite 45).

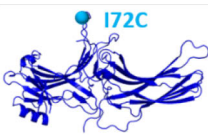
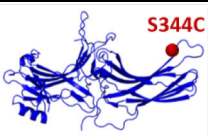
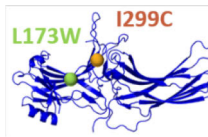
(Vishnivetskiy et al., 2007). In der hier vorliegenden Arbeit wurden zudem erstmals die höher phosphorylierten Fraktionen 6/7-P<sup>5</sup>) sowie 6/7-P<sup>5</sup>) isoliert.

### 3.3 Einfluss der Phosphorylierung auf die Stöchiometrie

#### 3.3.1 Verwendete Arrestinmutanten

Der Einfluss der Rezeptorphosphorylierung auf die Arrestinbindung wurde in dieser Arbeit durch Titrations mit fluoreszenzmarkierten Arrestinmutanten (*site-directed fluorescence experiments*) ermittelt. Für die Untersuchungen zur Bindung von Arrestin an Rhodopsin verschiedener Phosphorylierungsgrade wurden die Arrestinmutanten I299B/L173W, I72NBD und S344NBD verwendet, welche bereits ausführlich charakterisiert und funktionell im Wesentlichen äquivalent zum Wildtypprotein sind (Sommer et al., 2011).

**Tabelle 6:** Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Arrestinmutanten und deren Verhalten nach pRho-Bindung in Fluoreszenzexperimenten

Arr-Mutante	Label	$\Delta F$ nach pRho-Bindung	Literatur
	NBD/Bimane in der Finger-Schleife der N-Domäne	<b>Fluoreszenzanstieg</b> , wenn die Finger-Schleife des Arrestins an den aktiven, phosphorylierten Rezeptor bindet.	Sommer et al., 2007
	NBD in der 344-Schleife der C-Domäne	<b>Fluoreszenzanstieg</b> , wenn der Fluorophor durch pRho-Bindung des Arrestins mit der Membran oder einem benachbartem Rhodopsin interagiert.	Sommer et al., 2011 & 2012; Lally et al., 2017
	Bimane in der Tor-Schleife	<b>Fluoreszenzabfall</b> durch Konformationsänderungen innerhalb der Tor-Schleife, weil das zusätzlich eingebrachte Tryptophan in Fluorophornähe kommt und die Fluoreszenz löscht.	Sommer et al., 2015

Die drei Arrestinmutanten lassen Rückschlüsse auf die wichtigsten bei der Rezeptorbindung involvierten Bereiche innerhalb der Arrestinstruktur zu (siehe Tabelle 6). Arrestin I299B/L173W zeigt Konformationsänderungen innerhalb der „Tor-Schleife“ (*gate loop*, Asp<sup>296</sup> bis Asn<sup>305</sup>), die nur auftreten, wenn Arrestin den phosphorylierten, aktiven

Rezeptor (als Meta II) bindet (Kim et al., 2013). Die Bewegung der Tor-Schleife bringt den Fluorophor bei Aminosäurerest 299 räumlich näher an das Trp<sup>173</sup>, welches die Fluoreszenz löscht und damit zu einem Fluoreszenzabfall führt (Sommer et al., 2015). Arrestin S344NBD ist innerhalb der 344-Schleife der C-Kante (*C-edge*) markiert und zeigt einen Fluoreszenzanstieg, wenn Arrestin phosphoryliertes Opsin oder phosphoryliertes Meta II bindet, indem es in Kontakt mit der Membranumgebung kommt oder mit einem benachbarten Rhodopsin interagiert (Sommer, et al., 2011; 2012; Lally et al., 2017). Arrestin I72NBD ist in der Finger-Schleife (*finger loop*) markiert. Nach der Bindung des aktivierten, phosphorylierten Rezeptors kippt diese heraus und bindet am Rezeptorkern. Die Rezeptorbindung führt zum Anstieg der Fluoreszenz.

### 3.3.2 Fluoreszenzbasierte Bindungsanalysen

Die Bindungsstöchiometrie von Arrestin-1 und phosphoryliertem Rhodopsin (pRho)<sup>6)</sup> wurde in der Vergangenheit intensiv analysiert. Biochemische und biophysikalische Untersuchungen ergaben zunächst eine 1 : 1 Stöchiometrie; ein Ergebnis, das auch im Einklang mit der „normalen“ physiologischen Rolle des Arrestin in Stäbchenzellen ist (siehe 1.2.3 ab Seite 31). Nachdem die Kristallstruktur von Arrestin gelöst wurde, wiesen Modellierungsstudien auf die Möglichkeit einer 2 : 1 (pRho : Arr) Bindungsstöchiometrie hin. In den letzten Jahren konnte experimentell bestätigt werden, dass die Bindung von Arrestin an aktiviertes pRho in nativen Diskmembranen tatsächlich in verschiedenen stöchiometrischen Verhältnissen (1 : 1 bis 2 : 1 pRho : Arr) erfolgen kann (Sommer et al., 2011; 2012; Beyrière et al., 2015). Ein Faktor, der die Stöchiometrie beeinflusst, ist z.B. der relative Anteil des lichtaktivierten Rezeptors in den Diskmembranen (Sommer et al., 2011). Eine zusätzliche Abhängigkeit der Stöchiometrie von der durchschnittlichen Phosphorylierung des Rezeptors wurde in diesem Zusammenhang zwar vermutet (Sommer et al., 2012), konnte aber bisher nicht gezielt untersucht werden, da es nicht möglich ist, homogen phosphorylierte Rezeptorproben in Membranen zu gewinnen.

<sup>6)</sup> Aus Gründen der leichteren Lesbarkeit wurde in Abschnitt 3 „Diskussion“ durchgängig in den Angaben zur berechneten Stöchiometrie und den Komplexen in Text, Tabellen und in den Abbildungen die verkürzte Benennung „phosphoryliertes Rhodopsin“ oder die Abkürzung „pRho“ gewählt; gleichwohl beziehen sich sämtliche Angaben auf lichtaktiviertes, phosphoryliertes Rhodopsin.

Der Einfluss des Phosphorylierungsgrades auf die Arrestinbindung wurde in dieser Arbeit daher mit solubilisierten, über ConA-gereinigten und über MonoP-separierten Rhodopsinproben verschiedener Phosphorylierungsniveaus untersucht. Da bekannt ist, dass für die effektive Bindung von Arrestin an solubilisiertes Rhodopsin die Anwesenheit negativ geladener Lipide zwingend erforderlich ist (Sommer et al., 2006; Sommer & Farrens, 2006), wurden zunächst verschiedene negativ geladenen Lipide erprobt (siehe 2.4 ab Seite 47). Von den eingesetzten Lipiden (DOPA, Asolectin, Ölsäure sowie einer Phospholipidmischung aus 40 % Phosphatidylcholin, 40 % Phosphatidylethanolamin und 20 % Phosphatidylserin) erwies sich DOPA in isotonem Puffer (130 mM NaCl, pH = 7) als am besten geeignet.

In weiteren Vorversuchen wurden zunächst ungetrennte hoch- und mediumphosphorylierte pRho-Präparationen in Diskmembranen und nach Delipidisierung und Solubilisierung in DOPA/DDM verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass die durchschnittliche Phosphorylierung auch unter diesen Bedingungen die Bindungsstöchiometrie beeinflusst (siehe Tabelle 7).

**Tabelle 7:** Vergleich von hochP und mediumP der ungetrennten pRho-Proben

				hochP		mediumP	
Abb.	Arrestinmutante	Bedingungen		K <sub>D</sub> [μM]	pRho : Arr	K <sub>D</sub> [μM]	pRho : Arr
20	Arr I72NBD	St	M	0,30 ± 0,29	2 : (2,05 ± 0,53)	0,90 ± 0,50	2 : (0,34 ± 0,71)
23		St	D	0,003 ± 0,017	2 : (2,08 ± 0,15)	0,299 ± 0,099	2 : (1,24 ± 0,17)
27	Arr I299B/L173W	St	D	0,033 ± 0,064	2 : (1,99 ± 0,22)	0,496 ± 0,274	2 : (0,85 ± 0,42)
27		Z	D	0,004 ± 0,013	2 : (1,85 ± 0,12)	0,407 ± 0,332	2 : (1,44 ± 0,49)
Abkürzungen in der Tabelle							
Abb.	Daten dargestellt in Abbildung						
D	0,5 mM DOPA in 0,1 % DDM						
M	Membranen: ohne zugesetzte Phospholipide						
St	stationäre Fluoreszenzmessung ( <i>steady state fluorescence measurement</i> )						
Z	zeitbasierte Fluoreszenzmessung ( <i>time-based fluorescence measurement</i> )						

Für die Fluoreszenzmessungen wurden dabei zwei verschiedene Verfahren gegenübergestellt: Bei der stationären Messung wurden Fluoreszenzemissionsspektren vor bzw. eine und zwei Minuten nach Photoaktivierung des Rezeptors aufgenommen und die Fluoreszenzänderung durch Integration der Spektren berechnet. Mit dieser Methode können auch geringe Fluoreszenzänderungen zuverlässig detektiert werden. Zudem können Änderungen des Fluoreszenzmaximums bei der Arrestinbindung ermittelt werden. Da aber die

Geschwindigkeit der Arrestinbindung von der Arrestin-Konzentration abhängt und licht-aktiviertes Rhodopsin mit einer Halbwertszeit von etwa acht Minuten zerfällt (Heck et al., 2003), ist eine Messung bei einem definierten Zeitpunkt problematisch. Als alternative Methode wurde die Fluoreszenz über einen Zeitraum (bis 300 s) bei einer konstanten Wellenlänge gemessen. Obwohl die zeitbasierten Messungen eine geringere Empfindlichkeit besitzen, ermöglichten sie in diesem Fall eine genauere Bestimmung der maximalen Fluoreszenzänderungen. Die Bindungsstöchiometrie wurde durch Titrations mit Arrestin zu vorgelegtem pRho ermittelt. Hierfür wurden die einzelnen Datenpunkte der Titration an eine Bindungskurve angepasst, die aus der Definition der Dissoziationskonstante  $K_D$  aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitet wurde (siehe 4.7.5 ab Seite 132). Indem man die Rhodopsin-Konzentration, die bei den Experimenten immer 2  $\mu\text{M}$  betrug, bei der Berechnung als variablen Parameter einsetzt, kann die Stöchiometrie ermittelt werden (Sommer, Hofmann & Heck, 2011).

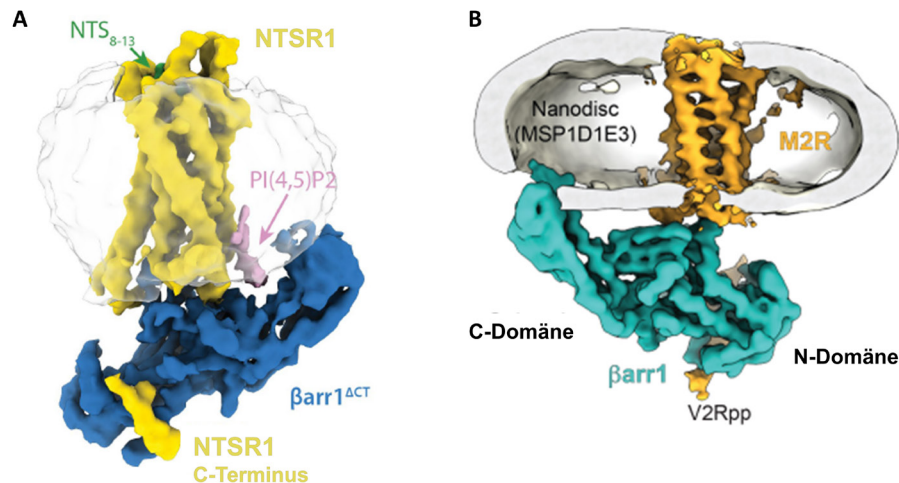
### **3.3.3 Fluoreszenzbasierte Bindungsanalysen mit isolierten pRho-Spezies**

In der vorliegenden Arbeit wurden insgesamt fünf unterschiedliche pRho-Präparationen portionsweise (6 mg bis 12 mg pRho) säulenchromatographisch aufgetrennt (RS-Läufe). Die Fraktionen von fünf RS-Läufen wurden letztendlich für die systematische Untersuchung der Bindungsstöchiometrie verwendet. Bei den einzelnen RS-Läufen wurden bis zu sieben Fraktionen unterschiedlich zusammengesetzter pRho-Spezies erhalten, die jeweils mit den drei Arrestinmutanten analysiert wurden. Insgesamt wurden daher im Rahmen dieser Arbeit mehr als 60 Arrestintitrationsläufe mit mehr als 400 Einzeltitrations durchgeföhrt. Ein zusammenfassender Überblick über die Ergebnisse dieser fluoreszenzbasierten Titrations ist in Tabelle 3 auf Seite 74 aufgeföhrt. Obwohl die erhaltenen Daten teilweise im Detail signifikant voneinander abweichen (siehe 3.4 ab Seite 94), zeigen die Ergebnisse der einzelnen Messreihen eindeutig, dass unterschiedliche Phosphorylierungsniveaus des Rezeptors die Arrestinbindung systematisch beeinflussen.

#### **i) Einfluss der Rezeptorphosphorylierung auf die Affinität von Arrestin**

Im Vergleich zu nativen Membranen ist die Affinität des Arrestins zu pRho in DOPA/DDM insgesamt geringer. Eine effektive Bindung erfolgt erst ab drei bis vier

Phosphatresten (in Membranen ab zwei); gering phosphorylierte Spezies wurden daher in dieser Arbeit nicht systematisch untersucht. Im Gegensatz zu pRho in Membranen, das bereits bei drei Phosphaten eine maximale Affinität erreicht, nimmt die Affinität von Arrestin zu pRho in DOPA/DDM bis sechs Phosphatreste weiter zu. Die im Vergleich zu Membranen reduzierte Affinität könnte verschiedene Ursachen haben. Es ist vorstellbar, dass eine Detergensbindung an hydrophobe Kontaktstellen der beiden Proteine kompetitiv wirkt, sodass ein höherer Phosphorylierungsgrad zum Erreichen der maximalen Affinität der beiden Proteine notwendig ist. Zudem könnte die unterschiedliche Geometrie der Lipidumgebung des Rezeptors die Affinität beeinflussen. Im Vergleich zur planaren Geometrie der Diskmembranen ist die Oberfläche der Phospholipid/Detergens-Mizellen stark gekrümmt. Tatsächlich zeigen neueste Strukturanalysen, dass  $\beta$ -Arrestin-1 in Komplex mit einem membrangebunden GPCR (Acetylcholin-M2-Rezeptor in Nanodisks; Staus et al., 2020) in einem kleineren Bindungswinkel gebunden ist als in Detergens (Neurotensinrezeptor 1 (NTSR1) in 0,004 % Laurylmaltoseneopentylglycol (LMNG)/0,0004 % 3 $\beta$ -Hydroxy-5-cholesten-3-hemisuccinat (CHS); Huang, et al., 2020) (siehe auch Abbildung 36 auf Seite 89). In beiden Fällen interagiert der „Membrananker“ von Arrestin (C-Kante/191-Schleife, Lally et al., 2017) mit der hydrophoben Lipidumgebung, sodass spekuliert werden kann, dass die Bindung des Arrestins an die Lipide ein wichtiges Strukturelement bei der Ausbildung der hochaffinen Bindung an den Rezeptor darstellt, das bei der Arrestin-Rezeptor-Interaktion in Mizellen insgesamt weniger effektiv ist. Interessanterweise ist auch die Geschwindigkeit der durch Rhodopsin katalysierten G-Protein-Aktivierung in Detergens (DDM) etwa zehnmal langsamer als in nativen Membranen (Ernst et al., 2007). Auch bei der Interaktion des G-Proteins mit dem Rezeptor bildet ein Membrananker (in diesem Fall eine Isoprenylierung der G $\gamma$ -Untereinheit und Acylierung der G $\alpha$ -Untereinheit) ein für die Affinität zum Rezeptor entscheidendes Strukturelement (Herrmann et al., 2006). Wie beim Arrestin hat der Membrananker des G-Proteins in den bisher veröffentlichten Strukturen der GPCR-G-Protein-Komplexe keinen direkten Kontakt zum Rezeptor. Da auch die Aktivität der Rhodopsinkinase von der Isoprenylierung des Proteins beeinflusst wird (Iglese et al., 1992), könnte die gekrümmte Oberfläche der Mizellen und die dadurch veränderte Bindungsgeometrie Grund für die verminderte Affinität der Signalproteine zum solubilisierten Rezeptor sein.



### Abbildung 36: Vergleich der Arrestinorientierung im $\beta$ -Arrestin-1-Komplex

(A) Kryo-EM-Struktur des phosphorylierten Neurotensin-Rezeptors 1 (NTSR1, gelb), der an Peptid NTS<sub>8-13</sub> (grün) mit  $\beta$ -Arrestin-1<sup>ACT</sup> ( $\beta$ arr1<sup>ACT</sup>, blau) gebunden ist. Interaktionen zwischen Rezeptor und  $\beta$ arr1<sup>ACT</sup> werden durch den phosphorylierten C-Terminus von NTSR1, den C-terminalen Teil der phosphorylierten dritten intrazellulären Schleife, den Rezeptorkern und ein Phosphatidylinositolbisphosphat-Molekül (rosa) vermittelt. Die C-Kante von  $\beta$ arr1<sup>ACT</sup> interagiert mit der Detergens-Mizelle (schwach grau) (modifiziert nach Huang et al., 2020). (B) Kryo-EM-Struktur HDL-M2Rpp- $\beta$ arr1-Komplexes, gefärbt wie folgt: orange: phosphorylierter Acetylcholin-M2-Rezeptor (M2Rpp); blau:  $\beta$ arr1; grau/weiß: HDL-Partikel (Nanodisk). Die orange gefärbte Dichte über  $\beta$ arr1 entspricht dem C-terminalen Phosphopeptid (V2Rpp), ligiert am Rezeptor (modifiziert nach Staus et al., 2020).

## ii) Einfluss der Rezeptorphosphorylierung auf die Bindungsstöchiometrie

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Stöchiometrie des pRho-Arrestin-Komplexes tatsächlich vom Phosphorylierungsgrad des Rezeptors abhängt. Bei den einzelnen Messreihen (d.h. an einem Tag durchgeführte Arrestintitrationen mit einer pRho-Präparation; siehe 2.4.4 ab Seite 60) zeigt sich, dass die Komplexe bei geringem Phosphorylierungsgrad eine 1 : 2 (Arr : pRho) Stöchiometrie aufweisen. Mit steigender Phosphorylierung ändert sich sukzessive die Stöchiometrie, bis bei einem hohen Phosphorylierungsgrad (ab 5/6-P) bevorzugt 1 : 1 pRho-Arrestin-Komplexe gebildet werden. Die Ergebnisse mit pRho-Spezies sehr hoher Phosphorylierung (6/7-P) sind in einem separaten Abschnitt diskutiert (siehe 3.3.4 ab Seite 92). Wie zu erwarten korreliert bis 5/6-P das Endniveau der einzelnen Arrestintitrationen mit der Bindungsstöchiometrie: Je geringer

das stöchiometrische Verhältnis Arr : pRho ist, desto weniger Arrestin bindet bei Sättigung an das vorgelegte pRho, sodass das Endniveau der jeweiligen Titrationskurve entsprechend kleiner ist. Demgemäß wird das höchste Endniveau bei einer Stöchiometrie von 1 : 1 (Arr : pRho) erreicht. Mögliche Ursachen für die Abhängigkeit der Bindungsstöchiometrie vom Phosphorylierungsgrad des Rezeptors werden in Abschnitt 3.5 ab Seite 98 detailliert diskutiert.

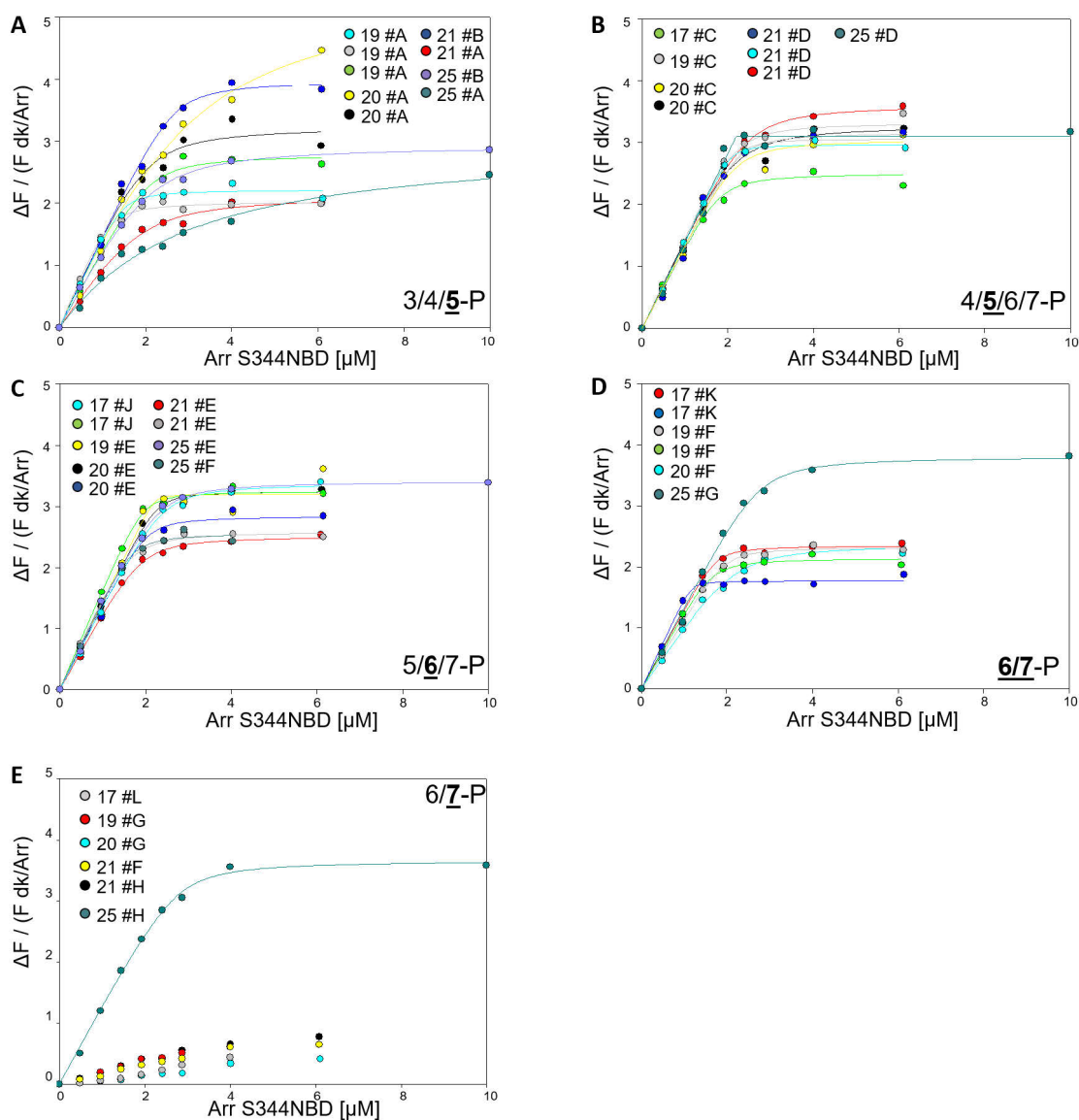
### **iii) Vergleich der unterschiedlichen Arrestinmutanten**

Am ausführlichsten wurde in der vorliegenden Arbeit Arr S344NBD untersucht. Da einige wenige pRho-Spezies (insbesondere 6/7-P- und 6/7-P) nur in geringen Mengen isoliert werden konnten, wurden diese Fraktionen der RS-Läufe nur stichprobenartig mit den Mutanten Arr I72NBD und Arr I299B/173W untersucht. Obwohl im Einzelnen Abweichungen erkennbar sind, zeigen die drei eingesetzten Arrestinmutanten ein sehr ähnliches Bild, d.h. es können insgesamt keine systematischen Unterschiede in der Rezeptorbindung der drei verwendeten Arrestinmutanten festgestellt werden. Die drei verwendeten Arrestinmutanten sind an unterschiedlichen Schlüsselpositionen innerhalb des Proteins markiert, sodass die Rezeptor-induzierten Fluoreszenzänderungen entsprechend unterschiedliche strukturelle Änderungen bei der Komplexbildung reflektieren (siehe Tabelle 6 auf Seite 84). Da die Bindungsstöchiometrie bei allen drei Mutanten gleichermaßen vom Phosphorylierungsgrad abhängt, legen die Ergebnisse nahe, dass die funktionellen Unterschiede auf eine globale Änderung der gebildeten Komplexstrukturen zurückzuführen ist (siehe weiterführende Diskussion zum Bindungsmechanismus in Abschnitt 3.5 ab Seite 98).

### **iv) Vergleich der unterschiedlichen Rezeptorpräparationen**

Es stellt sich die Frage, worin sich die pRho-Spezies-Proben ähnlicher Phosphorylierungszusammensetzung, die aus unterschiedlichen Präparationen gewonnen wurden, unterscheiden.





**Abbildung 37: Messungen einzelner pRho-Spezies mit Arr S344NBD**

Die Bindung von Arr S344NBD an pRho-Spezies 3/4/5-P (A), 4/5/6/7-P (B), 5/6/7-P (C), 6/7-P (D) & 6/7-P (E) aus RS17, RS19 bis RS21 & RS25 wurde exemplarisch an unterschiedlichen Tagen über einen zeitbasierten Fluoreszenzanstieg gemessen und auf die Steigung der Arrestin-Fluoreszenz in Dunkelheit normiert, um die Daten zu vergleichen. Titrations wurden mit den in Abbildung 32 auf Seite 68 aufgeführten Bedingungen durchgeführt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die gleichen x- und y-Achsenkalierungen verwendet.

Eine in dieser Arbeit als Rhodopsin-Präparation<sup>7)</sup> bezeichnete Präparation wurde jeweils aus einem Ausgangsmembranenstock gewonnen, phosphoryliert, aliquotiert und teilweise für mehrere chromatographische Auftrennungen (RS-Läufe) genutzt. In Tabelle 1 (siehe 2.3 auf Seite 45) ist die mit IEF ermittelte prozentuale Phosphorylierungsverteilung der einzelnen Fraktionen verschiedener RS-Läufe zusammengefasst. Es ist zu erkennen, dass die bei gleicher Ionenstärke eluierten Fraktionen („Absorptionspeaks“) generell auch eine vergleichbare Phosphorylierung aufweisen. Die genauen prozentualen Anteile der pRho-Spezies variiert allerdings zwischen den unterschiedlichen Präparationen. Diese Variationen in der Zusammensetzung der Fraktionen könnten zumindest teilweise die Abweichungen der Titrations unterschiedlicher Präparationen erklären (siehe Diskussion in 3.4 ab Seite 94). Leider verhindern die unten diskutierte mangelnde Vergleichbarkeit der Messreihen, die an unterschiedlichen Tagen gemessen wurden, eine genauere Analyse dieses Einflusses. Aus Abbildung 37 auf Seite 91 wird ersichtlich, dass eine Mittelwertbildung aller gemessenen Daten ähnlicher pRho-Spezies nicht zielführend ist, da die Abweichungen der einzelnen Titrations in vielen Fällen zu groß sind.

### 3.3.4 Hochphosphorylierte Rho-Spezies

Sehr hochphosphorylierte Rhodopsin-Spezies bilden sich *in vivo* nur zu einem geringen Anteil (Lee et al., 2010) und auch *in vitro* ist die Ausbeute dieser Spezies meist gering, sodass sie bisher nicht funktionell charakterisiert wurden. In einer kürzlich veröffentlichten Studie mit Phosphopeptiden wurde gezeigt, dass sich Phosphorylierungsstellen im Rezeptor-C-Terminus nicht nur aktivierend, sondern auch inhibierend auf die Arrestinbindung auswirken können. So konnte gezeigt werden, dass von der Phosphorylierungsstelle pT342 ein inhibitorischer Effekt ausgeht, da sie mit einer Abnahme der Arrestin-1-Affinität in Verbindung gebracht wird (Mayer et al., 2019).

Bei sehr hohem Phosphorylierungsgrad (6/7-P) nehmen bei Proben der Präparationen RS17 bis RS21 sowohl die Affinität des Arrestins als auch die Endniveaus der Titrations deutlich ab. Aufgrund der geringen Affinität kann in diesen Fällen die Stöchiometrie nicht

---

<sup>7)</sup> In dieser Arbeit wurden die Rhodopsin-Präparation, die für die RS-Läufe verwendet wurden, wie folgt benannt: pR18, pR21, pR24, pR26 sowie pR27. Für die Arrestinbindungsuntersuchungen wurden aliquotierte Proben der RS-Läufe #17 (Stock: pR18), #19 bis #21 (Stock: pR21) sowie #25 (Stock: pR26) verwendet (siehe auch Tabelle 12 bis Tabelle 15 ab Seite 156).

zuverlässig bestimmt werden. Im Gegensatz dazu zeigen die hochphosphorylierten Proben der Präparationen RS24 und RS25 nur eine sehr geringfügige Abnahme der Endniveaus. Bei diesen Proben ist die Affinität und Stöchiometrie (1 : 1) wie die Proben mit 5/6-P (Abbildung 54 auf Seite 157 & Abbildung 55 auf Seite 158).

Grund für die unterschiedlichen Endniveaus der Titrationsen könnte die unterschiedliche DDM-Konzentration in den Proben sein. In den meisten pRho-Präparationen ist der Anteil mit sehr hoher Phosphorylierung relativ gering, sodass die Fraktionen dieser pRho-Spezies vergleichsweise mehr aufkonzentriert wurden und daher der DDM-Gehalt entsprechend größer ist. Bei den Präparationen RS #24 und RS #25 wurde dagegen eine größere Menge pRho für die säulenchromatographische Trennung eingesetzt, sodass die Proben entsprechend weniger aufkonzentriert werden mussten. So beinhalten die Fraktionen  $H_{RS24}$  und  $\#H_{RS25}$  nur maximal 0,13 % DDM (Endkonzentration bei der Fluoreszenzmessung), wohingegen vergleichbare pRho-Spezies aus den RS-Läufen #17 bis #22 maximal 0,2 % DDM enthalten (also dem Doppelten der gewünschten DDM-Menge bei den Arrestinbindungs-messung). Ein Vergleich der DDM-Konzentration einzelner Proben (Abschätzung in Tabelle 4 in 2.4.6 auf Seite 76) zeigt oftmals eine nur geringe Korrelation mit den gemessenen Fluoreszenzänderungen. So weisen die Fraktionen  $\#I_{RS17}$  und  $\#J_{RS17}$  etwa das gleiche Endniveau auf (siehe Abbildung 32 auf Seite 68), haben mit 0,13 % und 0,14 % ähnliche maximale DDM-Gehalte. Dagegen hat Fraktion  $\#K_{RS17}$  mit 0,14 % die gleiche maximale DDM-Menge wie Fraktion  $\#J_{RS17}$ , jedoch sinkt das Endniveau bei  $\#K_{RS17}$  im Gegensatz zu der von  $\#J_{RS17}$ . Auch die Fraktionen  $\#E_{RS20}$ ,  $\#F_{RS20}$  sowie  $\#G_{RS20}$  weisen nach ihrer Aufkonzentration die gleiche maximale DDM-Menge von 0,20 % auf, bei den Fluoreszenztitrationsen sinkt jedoch auch hier das Endniveau. Damit verglichen weisen die Fraktionen  $\#B_{RS20}$  und  $\#E_{RS20}$  unterschiedliche maximale DDM-Gehalte auf (0,14 % sowie 0,20 %), jedoch haben beide pRho-Spezies in der ArrS344NBD-Titration etwa das gleiche Endniveau. Das verringerte Endniveau einzelner Titrationsen kann also nicht immer mit einem zu hohen Detergensgehalt erklärt werden.

Zur Untersuchung der Eigenschaften der hochphosphorylierten Rho-Spezies wurden auch Dephosphorylierungs-Experimente durchgeführt, d.h. die hochphosphorylierten Rho-Spezies wurden zunächst sukzessiv enzymatisch dephosphoryliert und anschließend mit Arrestintitrationsen charakterisiert. Die Ausgangsprobe mit 6/7-P ( $\#H_{RS24}$ ) zeigt eine Bindungsstöchiometrie von etwa 1 : 1 (2 : (2,3 ± 0,1) pRho : Arr). Sowohl 90 Sekunden

als auch drei Minuten Dephosphorylierungsdauer bewirken keine signifikante Änderung des Fluoreszenzendniveaus bzw. der Bindungsstöchiometrie. Erst nach zehn Minuten Dephosphorylierung sinken Affinität und Bindungsstöchiometrie ( $2 : (1,0 \pm 1,4)$  (pRho : Arr)), wobei keine signifikante Änderung des Fluoreszenzendniveaus erkennbar ist. Aufgrund der Materialknappheit konnten die dephosphorylierten Proben jedoch nicht mittels IEF-Methode analysiert werden. Proben, die unter vergleichbaren Bedingungen dephosphoryliert wurden, zeigen aber, dass innerhalb zehn Minuten Inkubation mit Alkalischer Phosphatase der mittlere Phosphorylierungsgrad auf etwa vier bis fünf Phosphate abnimmt (siehe Abbildung 17 auf Seite 41).

Es ist nicht bekannt, ob die Dephosphorylierung durch die Alkalische Phosphatase an bestimmten Positionen innerhalb des Rezeptor C-Terminus<sup>8)</sup> bevorzugt erfolgt bzw. in welcher Reihenfolge die Phosphatgruppen hydrolysiert werden. Vermutlich spiegelt aber die Dephosphorylierung nicht die „Umkehrung“ der Phosphorylierung durch die Rhodopsinkinase wider, da jeweils pRho-Spezies mit unterschiedlich phosphorylierten Positionen bevorzugt gebildet werden. So hängt z.B. das Phosphorylierungsmuster *in vivo* von den Belichtungsbedingungen und damit von der relativen Aktivität der Phosphatase 2A und der Rhodopsinkinase ab (Lee et al., 2010). Wie oben beschrieben, zeigen sich signifikante funktionelle Unterschiede z.B. bei pRho-Spezies mit fünf Phosphaten, sodass die Dephosphorylierungsexperimente vermutlich nicht in jeder Hinsicht mit den Messreihen unterschiedlich phosphorylierter pRho-Spezies vergleichbar sind.

### 3.4 Variabilität der Arrestintitationen

Insgesamt zeigte sich im Laufe der Arbeit, dass Arrestintitationen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, oftmals<sup>8)</sup> unterschiedliche Ergebnisse erzielen. Ein wesentlicher Teil der Arbeit bestand daher darin, Ursachen für diese Schwankungen zu identifizieren und die Reproduzierbarkeit der Messungen zu verbessern.

Zunächst ist auffallend, dass nahezu alle Titrations insofern „sehr gut“ sind, als dass die jeweiligen Datenpunkte nur wenig von der ermittelten Bindungskurve abweichen, die

---

<sup>8)</sup> Abweichungen sind z.B. in Abbildung 37 auf Seite 91 dargestellt; reproduzierbare Messungen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, sind z.B. im Anhang in Abbildung 54 und Abbildung 55 ab Seite 157 dargestellt.

Schwankungen einzelner Messwerte innerhalb einer Titration also generell sehr gering sind. Auch wenn eine pRho-Spezies eines RS-Laufes am gleichen Tag in Doppelbestimmung (d.h. zwei Aliquots der gleichen Fraktion) vermessen wurde, sind die Ergebnisse (Endniveaus der Arrestintitrationen, ermittelte Stöchiometrie und Affinität) in jeder Hinsicht gut reproduzierbar. Wurde eine pRho-Spezies eines RS-Laufes jedoch an unterschiedlichen Tagen gemessen, zeigt sich eine auffallende Variabilität der erhaltenen Titrationskurven (siehe z.B. Abbildung 54 und Abbildung 55 ab Seite 157).

Zu Beginn dieser Arbeit wurden jeweils ähnlich phosphorylierte pRho-Spezies aus den verschiedenen RS-Läufen an einem Tag vermessen. Aufgrund der hohen Variabilität der an verschiedenen Tagen gemessenen Titrationskurven ist eine nachträgliche Zusammenführung der erhaltenen Daten entsprechend des jeweiligen RS-Laufes nicht auswertbar. Um den Einfluss des Phosphorylierungsgrades des Rezeptors auf die Arrestinbindung analysieren zu können, wurden anschließend die einzelnen pRho-Spezies eines RS-Laufes jeweils an einem Tag vermessen. In der vorliegenden Arbeit sind daher nur die vollständig an einem Tag durchgeführten Arrestintitrationen eines RS-Laufes dargestellt (vgl. Abbildung 32 auf Seite 68: Arr S344NBD-Titrationskurven mit den pRho-Spezies der RS-Läufe #17, #19 sowie #21; Abbildung 30 auf Seite 62: Arr I299B/L173W-Titrationskurven sowie Abbildung 31 auf Seite 65: Arr I72NBD-Titrationskurven). Die so gewonnenen Messreihen zeigen jeweils die oben beschriebene Abhängigkeit der Arrestinbindung vom Phosphorylierungsgrad des Rezeptors. Es stellt sich die Frage, welche Faktoren für die relativ große Variabilität der an unterschiedlichen Tagen erhaltenen Arrestintitrationen verantwortlich sind. Denkbar sind Unterschiede der Präparationen (Rezeptor, Arrestin sowie Lipide) sowie bei der Handhabung der Proben und Durchführung der Experimente.

### **3.4.1 Unterschiede der Präparationen**

Im Gegensatz zu häufig verwendeten Phospholipidmischungen mit oftmals variabler Zusammensetzung wurde in dieser Arbeit ein definiertes, hochreines Phospholipid (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphat, DOPA) eingesetzt. Entsprechend zeigen unterschiedliche Chargen keine systematischen Unterschiede bei den Titrationskurven. Um Hydrolysen oder Oxidationen der Lipide zu minimieren, wurden zudem für jede Messreihe frisch ange-setzte DOPA/DDM-Präparationen verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden von allen drei Arrestinmutanten mehrere Präparationen untersucht. Es zeigt sich, dass unterschiedliche Präparationen fluorophormarkierter Arrestin-Proben bei Messungen mit der gleichen pRho-Spezies keine systematischen Abweichungen aufweisen, wenn sie an einem Tag gemessen werden. Auch die Zeitspanne der Lagerung der Proteinproben hat keinen erkennbaren Einfluss (Daten nicht dargestellt). Titrationsen mit gleichen Arrestin-Präparationen schwanken nicht mehr als mit unterschiedlichen Arrestin-Präparationen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass Variationen der Arrestin-Präparation nicht die Ursache der Schwankungen sind.

Unterschiedliche Rhodopsin-Präparationen ergaben (oft nur geringfügige) Unterschiede in der Zusammensetzung der jeweiligen Fraktionen der säulenchromatographischen Auftrennung (siehe 2.3 ab Seite 41 sowie 6.3.3 ab Seite 149). Allerdings erklärt das nicht die Variationen der Messungen gleicher pRho-Proben an unterschiedlichen Tagen. Ein Vergleich der Zeitpunkte der Präparation mit denen der durchgeführten Titrationsen zeigt, dass das Alter der pRho-Spezies ebenso keinen signifikanten Einfluss auf Bindungsstöchiometrie oder Endniveau hat. Zusammengefasst können Unterschiede bei den verwendeten Ausgangsmaterialien nicht Ursache für die Variabilität der Arrestintitrationsen, die an verschiedenen Tagen durchgeführt wurden, sein.

### **3.4.2 Unterschiede bei der Handhabung der Proben und Durchführung der Experimente**

Sämtliche Fluoreszenzmessungen wurden in einer thermostatisierten Küvette bei 20 °C durchgeführt. Auch die Schwankungen in der Umgebungsraumtemperatur waren gering (19 °C bis 21 °C thermostatisierter Raum), sodass ein Einfluss von Temperaturschwankungen ausgeschlossen werden kann. Es muss allerdings herausgestellt werden, dass alle Messungen an einem etwa 30 Jahre alten Fluoreszenzspektrometer (SPEX 1680 Fluorolog II) durchgeführt wurden, dessen mechanische Einstellungen (z.B. Spalt-Einstellung, Spiegelposition für Detektionsmethode usw.) nicht zu 100 % reproduzierbar sind. D.h., obwohl darauf geachtet wurde, dass für die jeweils verwendete Arrestinmutante bei den Messungen sämtliche Einstellungen am Gerät identisch waren, konnten Unterschiede der gemessenen Fluoreszenzintensität (*counts per second*) an verschiedenen Messtagen nicht verhindert werden. Es ist allerdings zu erwarten, dass gerätebedingte Schwankungen der

gemessenen Fluoreszenzintensität nur zu einer Skalierung der Messpunkte und nicht zu einer Änderung der Kurvenform führen. Um eine Vergleichbarkeit der Titrationsergebnisse zu erreichen und Mittelwertbildungen zu erlauben, wurden unterschiedliche Normierungen genutzt (siehe Abbildung 37 auf Seite 91). Für Normierungsvariante 1 wurde die Fluoreszenzänderung auf die Steigung der Ausgangsfluoreszenzkurve im Dunkeln normiert (siehe Abbildung 53 B & D auf Seite 156). Bei Normierungsvariante 2 & 3 wurde die Fluoreszenzänderung auf die Fluoreszenz von 1  $\mu\text{M}$  ungebundenem Arr S344NBD bzw. auf die Anfangsintensität der Fluoreszenz im Dunkeln (*baseline*) normiert. Die unterschiedlichen Normierungen konnten jedoch die Variabilität der Ergebnisse ebenfalls nicht beheben.

Der Zusatz negativ geladener Phospholipide zu den gereinigten pRho-Spezies ist für die Ausbildung der Arrestinbindung zwingend notwendig. Das negativ geladene Phospholipid (DOPA) wird zu den in Detergens (DDM) solubilisierten Rhodopsinproben zugegeben, sodass sich gemischte Lipid/Detergens-Mizellen bilden. Es ist vorstellbar, dass sich dabei Mizellen bilden, deren Zusammensetzung ungleichmäßig bzw. variable ist. Eine Variabilität könnte z.B. daher rühren, dass die Umverteilung der Lipide sehr langsam erfolgt und sich bis zur Messung kein echtes Gleichgewicht einstellt. Allerdings haben Dauer der Inkubation (bis zu drei Stunden) sowie unterschiedliche Verfahren der Vermischung von Lipid und Detergens (vgl. z.B. Abbildung 29 auf Seite 59) nur einen geringen Einfluss. Weitere Versuche zeigen, dass auch andere Faktoren, wie z.B. Zeitpunkt der Arrestinzugabe, keinen signifikanten Einfluss haben. Um dennoch Schwankungen durch unterschiedliche Handhabung der Proben auszuschließen, wurden sämtliche Schritte vor und während der Titration exakt gleich durchgeführt. Insbesondere bei der Präparation der DOPA/DDM-pRho-Proben und der Zugabe von Arrestin wurde exakt das gleiche Protokoll (d.h. gleiche Inkubationszeiten, gleiche Anzahl an Pipettivorgängen, gleiche Dauer und Schüttlerstufe bei Durchmischung der Proben, usw.) eingehalten. Sämtliche Arrestintitrationen, die ab 2.4.4 ab Seite 60 gezeigt wurden, wurden nach diesen Vorgaben durchgeführt. Trotz dieser Standardisierung konnten die Schwankungen zwischen den Ergebnissen gleicher pRho-Spezies-Proben, die an unterschiedlichen Tagen gemessen wurden, nicht verhindert werden.

Letztendlich konnte im Rahmen dieser Arbeit die Ursache für die Schwankungen der Messungen nicht ermittelt werden. Es kann vermutet werden, dass es (trotz sorgfältiger

und standardisierter Präparation) eine relativ große Variabilität bei der Bildung der gemischten Mizellen (Lipid/Detergens/Rhodopsin) gibt. Vorstellbar ist z.B., dass die Mizellen sowohl in ihrer Komposition als auch in ihrer Größe variieren. Zudem könnten sich auch innerhalb der Mizellen metastabile, inhomogene Strukturen bilden. So wurden z.B. in nativen Diskmembranen Entmischungen von Rhodopsin und Lipiden (Liang et al., 2003) sowie unterschiedlich mobile Populationen von Rhodopsin (Beyrière, 2015) beobachtet. Auch der Einbau von solubilisierten Rhodopsin in Phospholipidvesikeln ergibt bei großem Lipidüberschuss eine inhomogene Verteilung des Rhodopsins auf die Vesikel (nach persönlicher Information von Ernst & Heck; unveröffentlicht). Diese inhomogenen Strukturen in Membranen werden vermutlich von der Tendenz des Rhodopsins, Di- und Oligomere auszubilden, verursacht, wobei es bisher unklar ist, welche Faktoren dies beeinflussen.

### 3.5 Struktur und Bildung der Rhodopsin-Arrestin Komplexe

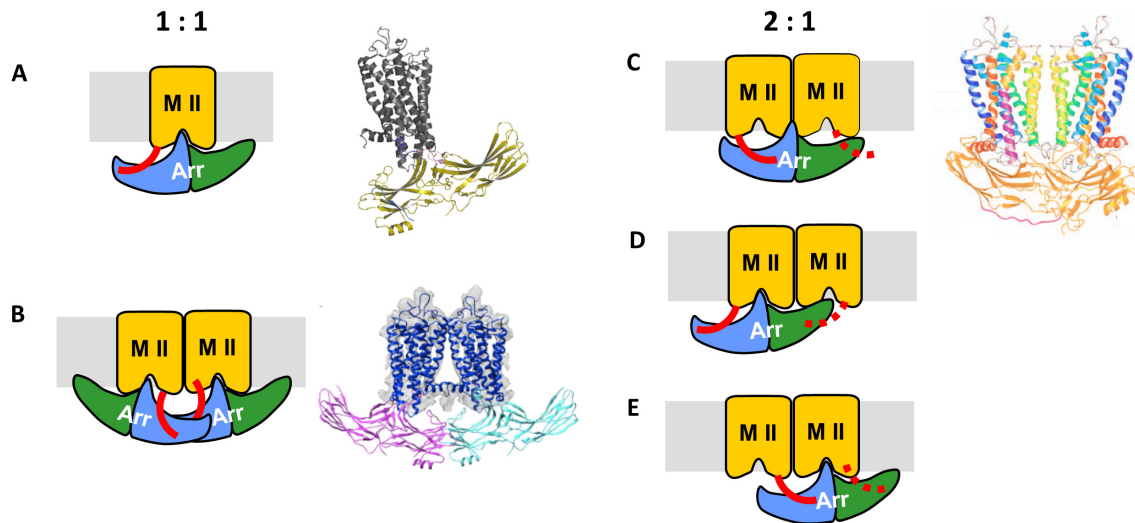
Wie in verschiedenen Studien zuvor (Sommer et al., 2011, 2012 & 2014) wurden in dieser Arbeit durch funktionelle Messungen sowohl eine 1 : 1 als auch eine 2 : 1 Rezeptor-Arrestin-Bindungsstöchiometrie erhalten. Alle bisher ermittelten Strukturen verschiedener GPCR-Arrestin-Komplexe weisen eine 1 : 1 Stöchiometrie auf (Kang et al., 2015; Zhou et al., 2017; Yin et al., 2019; Huang et al., 2020; Staus et al., 2020), wobei im Falle des Rhodopsins die 1 : 1 Stöchiometrie durch die Verwendung eines Rhodopsin-Arrestin-Fusionsproteins erzwungen wurde (Kang et al., 2015). Es stellt sich daher die Frage, wie eine 2 : 1 Rezeptor-Arrestin-Bindungsstöchiometrie auf molekularer Ebene interpretiert werden kann.

Zunächst wäre es möglich, dass die in den funktionellen Studien ermittelte 2 : 1 Stöchiometrie nicht die tatsächlichen Bindungsverhältnisse widerspiegelt. So könnten beispielsweise sterische Faktoren eine vollständige Besetzung aller Rezeptoren mit Arrestin verhindern. Insbesondere in nativen Diskmembranen, die eine extrem hohe Rhodopsindichte aufweisen (etwa  $25.000/\mu\text{m}^2$ ), ist es denkbar, dass bei einer quantitativen Photoaktivierung des Rhodopsins das Arrestin aus Platzmangel nicht jeden Rezeptor binden kann (siehe Diskussion in Sommer et al., 2011). Auf der anderen Seite zeigen FTIR-Messungen, dass auch in Diskmembranen alle Rhodopsinmoleküle durch Arrestin in der Meta II-



Konformation stabilisiert werden können (Beyrière et al., 2015), was eine funktionelle 1 : 1 Bindung der beiden Proteine nahelegt. Es ist kaum vorstellbar, dass ein Arrestinmolekül zwei lichtaktivierte Rhodopsinmoleküle in der Meta II Form stabilisiert, da hierfür die Interaktion der Finger-Schleife mit dem Rezeptorkern notwendig ist (siehe Bindungsmodelle in Abbildung 38 & Abbildung 39 ab Seite 100). Die in dieser Arbeit gemessene 2 : 1 Stöchiometrie in gemischten Phospholipid/Detergens-Mizellen ist daher sehr wahrscheinlich nicht durch eine sterische Behinderung verursacht.

Bei der Ausbildung von 2 : 1 (Rezeptor : Arrestin) Komplexen sind prinzipiell drei unterschiedliche Anordnungen der Proteine denkbar (siehe Abbildung 38 auf Seite 100). Die Struktur von Arrestin mit zwei konkaven Domänen sowie die Größenverhältnisse von Arrestin und Rhodopsin führten schon früh zu der Spekulation, dass sowohl die N- als auch die C-Domäne des Arrestins jeweils eigenständig einen Rezeptor binden kann (Übersicht in Park et al., 2004). Entsprechende *in silico* erhaltene Strukturmodelle (Modzelewska et al., 2006, siehe Abbildung 38 C) sind allerdings kaum kompatibel mit den inzwischen nachgewiesenen Kontaktstellen der beiden Proteine. Die zwei Hauptbindungsstellen von Arrestin am Rezeptor sind die Phosphosensoren der N-Domäne, die den phosphorylierten C-Terminus des Rezeptors binden, sowie die Finger-Schleife, die am Rezeptorkern bindet (siehe 1.2 ab Seite 23, siehe Abbildung 38 & Abbildung 39). Nach einem Modell von Sommer und Kollegen kann zusätzlich zu diesen beiden Hauptbindungsstellen die 344-Schleife der C-Domäne von Arrestin entweder mit der Membranoberfläche (im Falle einer 1 : 1 Bindung) oder mit einem benachbarten Rezeptor (im Falle einer 2 : 1 Bindung) interagieren (siehe Abbildung 38 C & D). Für letzteres wäre entweder die aktive Konformation oder die Phosphorylierung des zweiten Rezeptors ausreichend (Sommer et al., 2012).



**Abbildung 38: Modelle der möglichen Rhodopsin-Arrestin-Komplexe**

Modelle möglicher Rhodopsin-Arrestin-Komplexe (Bindungsstöchiometrien 1 : 1 (A, B) sowie 2 : 1 (pRho : Arrestin) (C bis E)). Orange: aktivierter Rezeptor, blau: N-Domäne von Arrestin (Arr); grün: C-Domäne von Arrestin rote Linie: hochphosphorylierter C-Terminus des Rezeptors; gestrichelte rote Linie: niedrig phosphorylierter C-Terminus des Rezeptors.

1 : 1 Stöchiometrie: (A) Ein Arrestin-Molekül bindet den aktivierten, phosphorylierten Rezeptor (links) sowie zugehörige Kristallstruktur des Ops\*-Arrestin-Komplexes (rechts; Kim et al., 2013). (B) Zwei Arrestin-Moleküle binden ein aktiviertes, phosphoryliertes Rezeptordimer (links) sowie zugehöriges Modell des Komplexes (rechts; das Modell basiert auf einer Kryo-EM-Struktur eines Rhodopsindimers; Zhao et al., 2019).

2 : 1 Stöchiometrie: (C, D, E) Ein Arrestin-Molekül bindet ein aktiviertes, phosphoryliertes Rezeptordimer (links) an unterschiedlichen Bindungsstellen (siehe Text für Details). (C, rechts) Zugehöriges Strukturmodell (Modzelewska et al., 2006). Die symbolische Darstellung der Proteine ist angelehnt an Sommer et al., 2014.

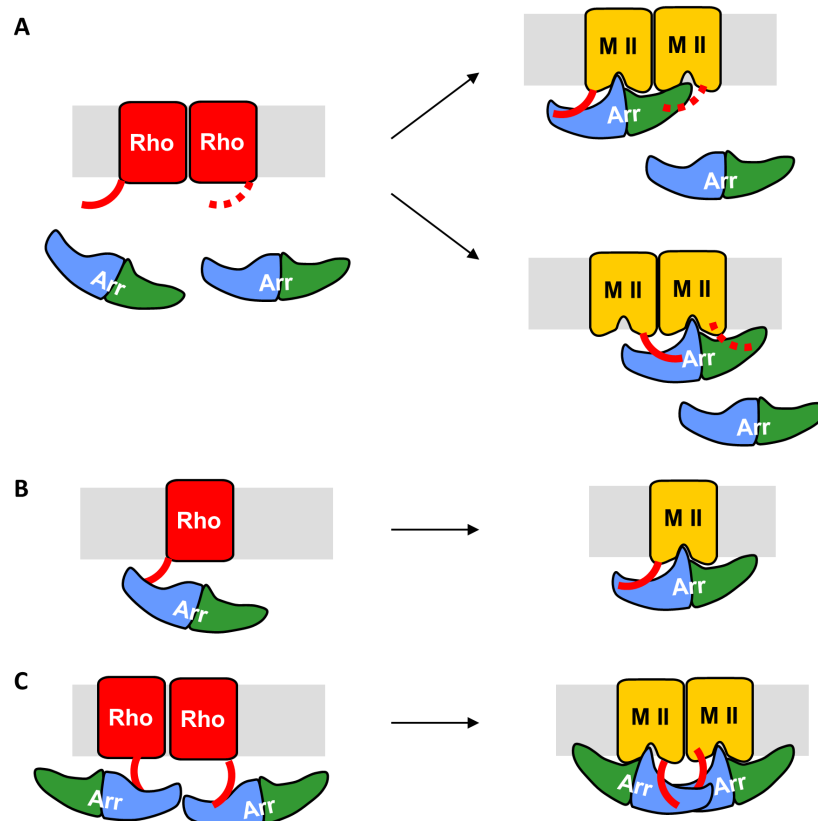
Da der C-Terminus des Rezeptors sehr flexibel ist und Arrestin auch an phosphoryliertes, inaktives Rhodopsin binden kann („Dunkelbindung“), ist auch ein drittes Bindungsmodell denkbar. In diesem Modell interagiert Arrestin mit dem phosphorylierten C-Terminus eines Rezeptors und bindet gleichzeitig mit der Finger-Schleife einen benachbarten Rezeptor am Rezeptorkern. In diesem Fall müsste der C-terminal gebundene Rezeptor phosphoryliert, aber nicht zwingend aktiviert sein und der via Finger-Schleife gebundene Rezeptor aktiviert, aber nicht zwingend phosphoryliert sein (siehe Abbildung 38 E). Beide letztgenannten Modelle (Abbildung 38 D und E) sind nach dem derzeitigen Wissensstand möglich, sodass es an dieser Stelle offenbleibt, welcher der beiden (bzw. ob beide) Bindungsmodi realisiert ist.

Des Weiteren stellt sich die Frage, wie der Phosphorylierungsgrad des Rezeptors die Bindungsstöchiometrie beeinflussen könnte. Hier sind vermutlich bereits vor der lichtaktivierung des Rezeptors gebildete Proteinkomplexe („*preformed complexes*“) ausschlaggebend, wobei sowohl vorgeformte Rezeptor-Arrestin-Komplexe als auch Rezeptordimere in Frage kommen (siehe Modelle in Abbildung 39 auf Seite 102).

In Lösung befindliches Arrestin liegt in einer inaktiven Konformation vor, die durch Interaktion mit dem phosphorylierten, lichtaktivierten Rezeptor schrittweise in eine aktive Konformation überführt wird (siehe Abbildung 39 A). Es ist bekannt, dass Arrestin auch an phosphoryliertes, inaktives Rhodopsin oder phosphoryliertes Opsin mit geringer Affinität binden kann (siehe z.B. Vishnivetskiy et al., 2007). Die Bindung führt (ebenso wie die Bindung phosphorylierter Peptide der C-terminalen Rezeptorsequenz) zu einer partiellen Aktivierung des Arrestins, d.h. die für die Ausbildung des hochaffinen Rhodopsin-Arrestin-Komplexes notwendigen Konformationsänderungen sind zum Teil bereits erfolgt (Mayer et al., 2019). Es ist daher gut möglich, dass sich der letztendlich gebildete Rezeptor-Arrestin-Komplex bei Lichtaktivierung vorgeformter Rezeptor-Arrestin-Komplexe von dem aus den separierten Proteinen entstandenen Komplex unterscheidet (siehe Abbildung 39).

Da die Affinität von Arrestin zu C-terminalen Rezeptorpeptiden (Mayer et al., 2019) sowie zu inaktivem Rhodopsin (Vishnivetskiy et al., 2007) mit zunehmender Phosphorylierung steigt, ist es naheliegend, dass, infolge der zunehmenden Dunkelbindung des Arrestins, die Rhodopsin-Arrestin-Komplexbildung vom Phosphorylierungsgrad abhängt.

Ein weiterer potenzieller Einflussfaktor auf die Komplexbildung ist die Ausbildung von Rezeptordimeren. Trotz zahlreicher Studien ist es bisher ungeklärt, ob Rhodopsin *in vivo* als Monomer oder in di- oder sogar oligomerer Form vorliegt. Unbestritten ist jedoch, dass *in vitro* Rhodopsin in unterschiedlichsten Lipidumgebungen (Diskmembranen, Nanodisks, Bizellen, Detergens) sowohl als Monomer als auch als Dimer vorliegen kann (siehe 1.1.8 ab Seite 21). Durch welche Faktoren die Dimerisierung beeinflusst wird, ist derzeit nicht bekannt. Es ist gut möglich, dass die Dimerisierung vom Phosphorylierungsgrad abhängt; z.B. könnte die Affinität der Rezeptoren zueinander mit zunehmender Phosphorylierung durch die zunehmende elektrostatische Abstoßung der C-Termini verringert sein.



**Abbildung 39: Bildung von Rhodopsin-Arrestin-Komplexen**

Modelle der möglichen Rhodopsin-Arrestin-Komplexe (Bindungsstöchiometrien 1 : 1 sowie 2 : 1 (pRho : Arr)). Rot: inaktiver Rezeptor; orange: aktivierter Rezeptor, blau: N-Domäne von Arrestin (Arr); grün: C-Domäne von Arrestin; rote Linie: hochphosphorylierter C-Terminus des Rezeptors; gestrichelte rote Linie: niedrig phosphorylierter C-Terminus des Rezeptors. (A) Ein Arrestin-Molekül, das vor Rezeptoraktivierung in Lösung war, bindet nach Lichtaktivierung ein phosphoryliertes Rezeptordimer (links). (B) Ein Arrestin-Molekül bindet bereits im Dunkeln den phosphorylierten, inaktiven Rezeptor lose; nach Lichtaktivierung bildet sich eine hochaffine Rezeptorbindung mit einer Stöchiometrie 1 : 1 aus. (C) Zwei Arrestin-Moleküle binden bereits im Dunkeln ein phosphoryliertes, inaktives Rezeptordimer mit geringer Affinität; nach Lichtaktivierung bildet sich eine hochaffine Rezeptorbindung mit einer Stöchiometrie 1 : 1 aus. Die symbolische Darstellung der Proteine ist angelehnt an Sommer et al., 2014.

Zusammengefasst kann folgende Hypothese aufgestellt werden: Bei geringer Phosphorylierung liegen die Rezeptoren in den gemischten Detergens/Phospholipid-Mizellen bevorzugt als Dimere vor. Gleichzeitig ist der Anteil vorgeformter Rhodopsin-Arrestin-Komplexe gering, sodass Arrestin nach Lichtaktivierung aus der Lösung an die Rezeptordimere bindet und 2 : 1 Komplexe ausbildet. Mit zunehmender Phosphorylierung

nimmt die Dimerisierung der Rezeptoren ab und die Dunkelbindung von Arrestin an Rhodopsin zu, sodass nach Lichtaktivierung bevorzugt 1 : 1 Komplexe entstehen.

In diesem Zusammenhang ergibt sich schließlich die Frage, warum sich bei den Titrationsexperimenten bei geringem Phosphorylierungsgrad auch mit einem Arrestin-Überschuss 2 : 1 Rezeptor-Arrestin-Komplexe bilden. Wenn eine 1 : 1 Stöchiometrie möglich ist, sollten sich im thermodynamischen Gleichgewicht bei hohen Arrestinkonzentrationen entsprechend 1 : 1 Komplexe bilden. Dass dies nicht erfolgt, zeigt, dass die Komplexbildung kinetisch kontrolliert ist, d.h. durch die Arrestinbindung eine bestimmte Situation „eingefroren“ wird. Um das thermodynamische Gleichgewicht zu erreichen, müsste man sehr lange Inkubationszeiten nutzen. Dies ist in diesem Fall jedoch nicht möglich, da der Zerfall der aktiven Rezeptorkonformation in Opsin und all-*trans*-Retinal schneller erfolgt, als die Dissoziation des Arrestins vom aktiven Rezeptor.

### 3.6 Physiologische Rolle der unterschiedlichen Stöchiometrien

Abschließend stellt sich die Frage, worin die physiologische Rolle einer variablen Stöchiometrie liegen könnte und welchen Einfluss hierbei der Phosphorylierungsgrad bzw. das Phosphorylierungsmuster von Rhodopsin hat. Unter alltäglichen Beleuchtungsverhältnissen (z.B. dauerhafte Belichtung durch Tageslicht unterschiedlicher Intensität; die Stäbchen liegen weitestgehend gesättigt vor) ergeben sich Unterschiede im Phosphorylierungsgrad und -muster aus dem Zusammenspiel der Phosphorylierung durch die Rhodopsinkinase und der Dephosphorylierung durch die Phosphatase 2A. Beide Reaktionen hängen auf komplexe Art und Weise von der Lichtintensität ab: Die Aktivität der Rhodopsinkinase wird vermutlich durch das calciumbindende Protein Recoverin reguliert und die Dephosphorylierung hängt von der Arrestinbindung ab, wobei letztere wiederum durch die lichtabhängige Translokation des Arrestins zwischen Innen- und Außensegment beeinflusst wird. Zusätzlich hängen alle diese Reaktionen vom Zerfall des lichtaktivierten Rezeptors in Opsin und all-*trans*-Retinal sowie der Regeneration von Opsin zu Rhodopsin mit 11-*cis*-Retinal und somit vom Retinalmetabolismus und -transport zwischen Stäbchenzelle und Pigmentepithel ab.

Die Phosphorylierung von Rhodopsin wurde in den meisten Studien nur unmittelbar nach kurzer Belichtung von dunkeladaptierten Retinae bzw. Versuchstieren untersucht. Die

unter diesen relativ unphysiologischen Bedingungen ermittelten Phosphorylierungsgrade und -stellen sind widersprüchlich. Leider gibt es bislang nur eine Studie, in der der Phosphorylierungsgrad *in vivo* bei langer Belichtung mit unterschiedlichen Intensitäten analysiert wurde (Lee et al., 2010). Demnach ist bei einer 90-minütigen Belichtung der Phosphorylierungsgrad bei hoher Lichtintensität insgesamt deutlich größer als bei niedriger Intensität, überraschenderweise war aber einfachphosphoryliertes Rhodopsin auch bei hoher Lichtintensität die dominierende Spezies. Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Einfluss der Phosphorylierung auf die Bindungsstöchiometrie könnte demnach bedeuten, dass eine 2 : 1 (pRho : Arr)-Bindungsstöchiometrie bei Dauerlicht niedriger Lichtintensität bevorzugt wäre und mit ansteigender Intensität zunehmend 1 : 1 Komplexe gebildet werden.

Über die Funktion einer variablen Rezeptor-Arrestin-Stöchiometrie kann derzeit nur spekuliert werden. Denkbar ist z.B., dass durch die Bildung von 2 : 1 (pRho : Arr)-Komplexen die Bindung von Arrestin an sehr gering phosphorylierte Rezeptoren, die Arrestin alleine nicht binden können, ermöglicht wird. Ein ausreichend phosphorylierter Rezeptor würde dabei zunächst Arrestin aktivieren und so die Bindung eines weiteren, gering phosphorylierten Rezeptors induzieren. Mit diesem Mechanismus könnte auch das bei dauerhafter Belichtung der Stäbchenzellen entstehende einfachphosphorylierte Rhodopsin zuverlässig inhibiert werden.

Sommer und Kollegen (2014) stellten die Hypothese auf, dass Arrestin nicht nur den Signalweg bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen effizient blockieren kann, sondern zusätzlich die Freisetzung des toxischen all-*trans*-Retinals bei hohen Lichtintensitäten verringert. Demnach würde Arrestin bei hoher Lichtintensität und im *steady state* zusätzlich einen benachbarten Rezeptor binden (2 : 1 Stöchiometrie), wobei unter diesen Bedingungen einer der beiden gebundenen Rezeptoren in der aktiven Meta II-Konformation gehalten wird, bis die all-*trans*-Retinal-Konzentration in der Zelle abnimmt. Die Hypothese basiert auf Messungen, die zeigen, (i) dass sich in isolierten Diskmembranen bei quantitativer Rhodopsinaktivierung zunächst 1 : 1 Komplexe bilden, beim anschließenden Zerfall der aktiven Konformation aber nur einer der beiden Rezeptoren in Opsin und all-*trans*-Retinal zerfällt (Beyrière et al., 2015) und (ii) dass Arrestin die Aufnahme von

all-*trans*-Retinal nur in 50 % des Opsins induziert (Sommer et al., 2014). Da der Phosphorylierungsgrad des Rezeptors bei diesen Messungen nicht ermittelt wurde, ist ein direkter Vergleich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht möglich.

Neben dem Phosphorylierungsgrad könnte auch das Phosphorylierungsmuster entscheidend für die Ausbildung unterschiedlicher Bindungsstöchiometrien sein. Diverse Studien haben bisher gezeigt, dass unterschiedliche Phosphorylierungsmuster am intrazellulären C-Terminus von GPCRs als „Phosphorylierungs-Barcode“ wirken, indem sie unterschiedliche aktive Konformationen von Arrestinen induzieren, die wiederum zu einer Vielzahl von zellulären Ereignissen führen (Xiao et al., 2004; Kim et al., 2005; Shukla et al., 2008; Zidar et al., 2009; Butcher et al., 2011; Liggett, 2011; Nobles et al., 2011; Inagaki et al., 2015; Prihandoko et al., 2015; Yang et al., 2015 & 2018). Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Mayer und Kollegen gibt zudem Hinweise auf die relative Bedeutung der sieben potenziellen Phosphorylierungsstellen und das Muster der Phosphorylierung für die Rekrutierung und Aktivierung von Arrestin-1, -2 sowie -3 (Mayer et al., 2019). Hierfür wurden synthetische Peptide eingesetzt, die verschiedene Phosphorylierungsmuster am C-Terminus von Rhodopsin imitieren. Es wurden T340 und S343 als Schlüsselstellen („*key sites*“) für eine feste Bindung des Arrestin-1 identifiziert. Weitere Phosphorylierungsstellen (T335 und S338) wurden als schwache Rekrutierungsstellen der Arrestinbindung zugeordnet. Die Phosphorylierung von T342 führte dagegen zu einer Abnahme der Arrestin-1-Affinität. Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass nicht ausschließlich die Menge der Phosphate am C-Terminus entscheidend dafür ist, wie gut und mit welchem Bindungsmodus Arrestin den phosphorylierten Rezeptor bindet.

### 3.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass mit den durchgeführten Messungen nicht alle Fragen beantwortet werden konnten. Durch welche Präparationen und Methoden könnten die offengebliebenen Punkte geklärt werden?

Zunächst wäre eine massenspektroskopische Analyse des Phosphorylierungsmusters der verwendeten Rhodopsinproben notwendig, um die Vermutung zu bestätigen, dass nicht nur die Anzahl der C-terminalen Phosphate, sondern auch das Phosphorylierungsmuster

die Bindung des Arrestins an Rhodopsin beeinflusst. Obwohl die säulenchromatographische Auftrennung der unterschiedlichen Rhodopsin-Spezies verbessert werden könnte (andere Säulenmaterialien, Puffersysteme, Salzgradienten usw.), ist es vermutlich nicht möglich, völlig homogen phosphorylierte Rhodopsin-Spezies aus nativen Präparaten zu isolieren. Zudem müsste hierfür das Ausgangsmaterial erheblich erhöht werden, was zu sehr hohen Materialkosten führen würde. Alternativ könnten Rhodopsinmutanten mit unterschiedlichen Phosphorylierungsstellen zum Einsatz kommen; in der Praxis scheiterte dieses Vorgehen bisher aber an der Expression funktioneller Rhodopsinkinase und den relativ geringen Rhodopsin-Ausbeuten. Eine praktikablere Alternative ist die Analyse der Arrestinbindung an unphosphoryliertes Rhodopsin in Gegenwart von selektiv phosphorylierten, synthetischen Peptiden der C-terminalen Rezeptorsequenz (vgl. z.B. Mayer et al., 2019). Dieser Ansatz wird derzeit in der AG Sommer/Heck verfolgt.

Verschiedene Zusammensetzungen und Präparationsmethoden der Lipid/Detergens-Mizellen wurden in dieser Arbeit untersucht (siehe 2.4.2 ab Seite 48); dabei erwiesen sich die verwendeten DOPA/DDM-Mizellen als am besten geeignet. Wie sich letztendlich herausstellte, muss dennoch die Reproduzierbarkeit der Messungen verbessert werden. Zentrales Problem bei der Wahl der Messbedingungen ist Folgendes: Um den Einfluss der Phosphorylierung auf die Arrestin-induzierte oder präformierte Rhodopsin-Dimerisierung (bzw. Oligomerisierung) zu untersuchen, muss eine dynamische Rhodopsin-Dimerisierung, gleichzeitig aber auch die Arrestinbindung (negativ geladene Phospholipide) möglich sein. Daher sind eine Reihe von sehr gut charakterisierten Präparaten, wie z.B. Nanodisks oder reine Detergens-Mizellen, für diese Messungen ungeeignet. Eine Alternative zu den hier verwendeten Lipid/Detergens-Mizellen ist der nachträgliche Einbau der isolierten Rhodopsin-Spezies in Lipidvesikel. Diese Strategie wurde in dieser Arbeit nicht verfolgt, zum einen weil bei der Vielzahl der zu untersuchenden Proben der zeitliche Aufwand viel zu groß gewesen wäre, zum anderen weil die Rhodopsindichte in den erhaltenen Proteoliposomen ebenfalls inhomogen ist (nach persönlicher Information von Ernst & Heck; unveröffentlicht). Dennoch wäre die Verwendung von Proteoliposomen die einzige Alternative zu den gemischten Lipid/Detergens-Mizellen.

Zur Strukturaufklärung der Rhodopsin-Arrestin-Komplexe ist die Kryo-Elektronenmikroskopie die Methode der Wahl, da durch die Einzelmolekülmessung die Strukturen, trotz der zu erwartenden Heterogenität, analysiert werden können. Allerdings bleibt auch



hier die oben beschriebene Problematik der verwendeten Präparationen und dass Phosphorylierungsgrad und -muster kaum mit den erhaltenen Strukturen korreliert werden können.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Geräte

Für die experimentellen Arbeiten wurden die folgenden technischen Geräte verwendet:

**Tabelle 8:** Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
Eismaschine	Eismaschinen GmbH ZIEGRA
Electrophoresis Power Supply E865	Consort
FPLC	Amersham Pharmacia Biotech
Gefrierkühlschrankskombination	Liebherr
Gel Doc <sup>TM</sup> 2000	BioRAD
HPLC mit Reprosil 70 Si, 5 µM, 300 x 20 mm Säule	Beckmann System Gold
IEF-Kammer	VWR
IKA Rotationsverdampfer RV 10 digital mit Wasserbad IKA HB10	VWR
Inkubator Certomat IS	B.Braun Biotec International
Kaltlichtquelle LQ1600	Fiberoptics-Heim
Kipp-/Rollenmischer SRT2 mit 10 Rollen	Stuart
Magnetrührer C-MAG HS7	IKA
Microfluidizer <sup>®</sup>	Microfluids
MilliQ <sup>®</sup> -Anlage	MERCK Millipore
pH-Meter	SCHOTT
Pipettierhelfer accu-jet <sup>®</sup> pro	BRAND
Präzisionswaage CP64	Sartorius
Quartzküvetten	Hellma Analytics
Research Pipettensatz	Eppendorf
SPEX Fluoreszenzspektrometer	1680 Fluorolog II
Thermomixer comfort 5436	Eppendorf
Ultraschallbad Bandelin Sonorex TK20	Bandelin Electronics
Ultrazentrifuge Optima <sup>TM</sup> MAX-XP	Beckmann Coulter
Ultrazentrifuge Optima <sup>TM</sup> L-90 K	Beckmann Coulter
Unimax Schüttler 2010	Heidolph
UV/Vis-Spektrometer Cary 50 Bio	Varian
Vakuumpumpe	Vacuubrand
Vortex-Genie 2	Scientific industries, Inc.
Waage PM 4600 Delta Range	Mettler
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf

Gerät	Hersteller
Zentrifuge Avanti <sup>TM</sup> J-25	Beckmann Coulter
Zentrifuge Heraeus <sup>TM</sup> Megafuge <sup>TM</sup> 16 R	Thermo Scientific
Zentrifuge MiniSpin <sup>®</sup> Plus	Eppendorf
Zentrifugenrotor JA 25.50	Beckmann Coulter
Zentrifugenrotor TLA 110	Beckmann Coulter
Zentrifugenrotor SW32	Beckmann Coulter
Zweiwellenlängenspektrometer	Shimadzu UV3000

## 4.2 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Alle Materialien, die im Laboratorium zum Einsatz kamen, sowie Reaktionsgefäße, serologische Pipetten, Falcon-Röhrchen, Pipettenspitzen oder Zellkulturschalen wurden von den Firmen Eppendorf, SARSTEDT oder MERCK verwendet. Die verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders genannt, von den Firmen Carl Roth, Sigma-Aldrich, MERCK oder Fluka Analytics bezogen. Die verwendeten Pufferlösungen sind in Tabelle 10 auf Seite 146 aufgelistet.

## 4.3 Software

Zur Darstellung, Berechnung, Regression und Auswertung sämtlicher Daten wurden die Programme SigmaPlot 13.0, GelQuant, Microsoft Office Excel 2016 und Microsoft Office PowerPoint 2016 verwendet.

## 4.4 Präparationen

Sofern nicht anders aufgeführt, wurden sämtliche Präparationen und Experimente unter schwachem Rotlicht (Rotfilter RG 650 der Firma Schott) durchgeführt. Für die Photoaktivierung von Rhodopsin wurde eine Lichtquelle (150 W) mit Langpassfilter (>495 nm) genutzt.

#### **4.4.1 Präparation der Außensegmente der Stäbchenzelle**

Die verwendeten bovinen Retinae wurden von der W.L. Lawson Company (USA) bezogen oder direkt aus Kuhaugen gewonnen, die von einem Schlachthaus in Teterow erstanden wurden. Um die für die Versuche benötigten Retinae zu erhalten, wurden Augen geschlachteter Rinder wie folgt präpariert: Mit einer Schere wurde in die Cornea gestochen und das Rinderauge wurde aufgeschnitten, sodass Linse und Glaskörper entfernt werden konnten. Nach Umstülpen des Auges wurde die Retina vorsichtig mit der Schere abgelöst, in eisgekühlter 45 %-iger Saccharose in Puffer A (70 mM Kaliumphosphat, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5 mM PMSF, pH = 7) gesammelt und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Die Präparation der Außensegmente der Stäbchenzellen (ROS) erfolgte in abgewandelter Form nach Papermaster (1982). Hierfür wurde die Suspension von 150 Retinae in eine 250-ml-Flasche überführt und vier Minuten kräftig geschüttelt, was zum Brechen der Cilien zwischen Außen- und Innensegment der Stäbchenzellen führt (Young, 1976). Nach Aufteilen der Retinasuspension in acht 35-ml-Zentrifugengefäße und Zentrifugation (5.000 rpm, 5 min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , JA 25.50) wurde der Überstand durch ein Baumwolltuch filtriert, um so die Außensegmente von den restlichen Zellbestandteilen abzutrennen, und mit Puffer A 1 : 1 verdünnt. Das Filtrat wurde erneut in acht Zentrifugationsgefäße aufgeteilt, zentrifugiert (7.000 rpm, 7 min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , JA 25.50) und dekantiert. Die Pellets wurden mit insgesamt 40 ml 25,5 %-iger Saccharoselösung ( $\rho = 1,105\text{ g/cm}^3$ ) resuspendiert, auf vier diskontinuierliche Saccharosedichtegradienten (je 14 ml 27,125 %-iger Saccharoselösung ( $\rho = 1,115\text{ g/cm}^3$ ), welche mit 14 ml 32,25 %-iger Saccharoselösung ( $\rho = 1,135\text{ g/cm}^3$ ) unterschichtet wurden) aufgetragen und zentrifugiert (25.000 rpm, 30 min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , mit Beckmann SW 32 Schwingrotor). Alle Saccharoselösungen wurden zuvor in Puffer A angesetzt und via Aräometer auf die gewünschte Dichte eingestellt. Bei der Schnittstelle zwischen 1,115 und  $1,135\text{ g/cm}^3$  sammelten sich nach Zentrifugation die Stäbchenaußensegmente, welche vorsichtig abgenommen und im Verhältnis 1 : 1 mit Puffer A verdünnt und zentrifugiert wurden (20.000 rpm, 30 min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ , JA 25.50). Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Zentrifugengefäße mit den Pellets in Alufolie verpackt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### **4.4.2 Präparation der gewaschenen Diskmembranen**

Gewaschene Diskmembranen (*washed membranes*, WMs) wurden aus zuvor gewonnenen ROS isoliert. Da unter hypotonen Bedingungen die Plasmamembran aufplatzt und die peripheren Membranproteine von den Diskmembranen dissoziieren (Kühn et al., 1982), verbleibt fast ausschließlich das integrale Membranprotein Rhodopsin in den Diskmembranen.

Die zuvor präparierten Pellets der Stäbchenaußensegmente wurden auf Eis aufgetaut, mit Puffer B (5 mM PIPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7) resuspendiert und zentrifugiert (25.000 rpm, 20 min, 4 °C, JA 25.50). Der Überstand wurde dekantiert und der Waschschritt mit Puffer B und Zentrifugation dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Pellets in Puffer C (20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, pH = 7,5) resuspendiert. Nach spektroskopischer Konzentrationsbestimmung (siehe 4.5.2 auf Seite 114) wurde die gewünschte Konzentration eingestellt. Die Proben wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -40 °C gelagert.

#### **4.4.3 Präparation des phosphorylierten Rhodopsins**

Der Phosphorylierung von Rhodopsin mit endogener Rhodopsinkinase lag ein abgewandeltes Protokoll von Sommer und Kollegen (2011) zugrunde. Hierfür wurden ROS-Pellets aufgetaut, mit insgesamt 40 ml 100 mM Puffer D (14 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> & 7 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ad 1 l, pH = 7,4) resuspendiert und mithilfe eines Homogenisators die Plasmamembran aufgebrochen und die Disks vereinzelt. Nach Einstellen der Rhodopsinkonzentration auf 10 µM bis 15 µM wurde die äquimolare Menge 11-*cis*-Retinal (eigene Herstellung aus all-*trans*-Retinal, siehe 4.4.4 ab Seite 112) zugegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 8 mM ATP hinzugegeben und die Phosphorylierung durch die endogene Rhodopsinkinase gestartet, indem die ROS bei RT mit einer Kaltlichtquelle (mit vollem Lichtspektrum) belichtet wurden (zwei Stunden für hochphosphorylierte Membranen mit fünf-, sechs- & siebenfach phosphoryliertem C-Terminus; 10 min für mediumphosphorylierte Membranen oder gar nicht für unphosphorylierte Membranen). Danach wurden die Membranen mit 20 mM Hydroxylamin (HA) versetzt

und für 15 min bei RT inkubiert, damit alle Rhodopsinphotoprodukte nach der Belichtung zu phosphoryliertem Opsin und Retinaloxim reagierten.

Das phosphorylierte Opsin wurde auf vier 40-ml-Zentrifugationsröhrchen verteilt und zentrifugiert (20.000 rpm, 30 min, 4 °C, JA 25.50). Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets mit Puffer D gewaschen, homogenisiert und erneut zentrifugiert (20.000 rpm, 30 min, 4 °C, JA 25.50). Dieser Waschschrift wurde einmal mit Puffer D und zweimal mit salzfreiem Puffer E (50 mM HEPES, pH = 7) wiederholt, welcher die Dissoziation restlicher Proteine von den Diskmembranen fördert. Abermals wurden die phosphorylierten Membranen pelletiert (20.000 rpm, 30 min, 4 °C, JA 25.50), die Pellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –20 °C gelagert.

Um aus dem phosphorylierten Opsin wieder Rhodopsin zu erhalten, mussten die Membranen mit 11-*cis*-Retinal regeneriert werden (Hofmann et al., 1992). Zum Regenerieren wurde das phosphorylierte Opsin mit dreifach molarem Überschuss an 11-*cis*-Retinal versetzt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurden die phosphorylierten Membranen mit 50 mM HA versetzt und für 15 min bei RT inkubiert. Das phosphorylierte Rhodopsin wurde pelletiert (20.000 rpm, 30 min, 4 °C, JA 25.50), sodass der Überstand vorsichtig dekantiert werden konnte, da besonders hochphosphorylierte Membranen nur ein weiches Pellet aufwiesen. Die Pellets wurden in Puffer E resuspendiert, homogenisiert und erneut pelletiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Vor der 2. Wiederholung wurde ein Aliquot zur Konzentrationsmessung abgenommen und photometrisch vermessen. Die Pellets wurden in der gewünschten Konzentration in Puffer E aufgenommen, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### 4.4.4 11-*cis*-Retinal-Herstellung

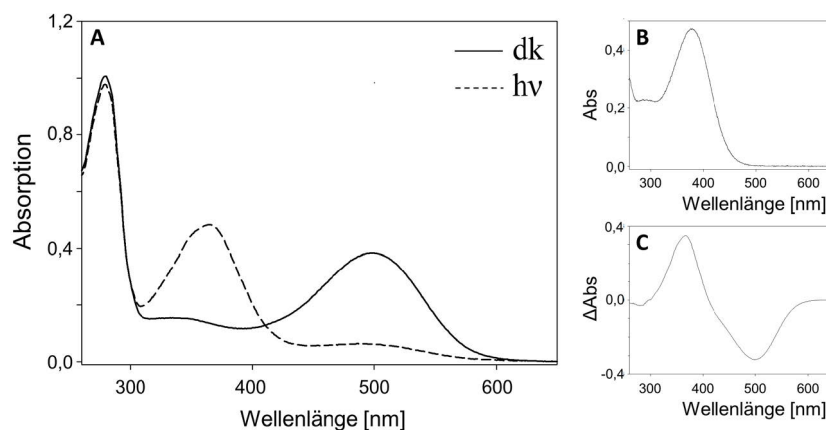
Das zum Regenerieren des Rhodopsins verwendete 11-*cis*-Retinal wurde aus all-*trans*-Retinal (Sigma) nach bisher bekanntem Protokoll hergestellt (Garwin & Saari, 2000): Hierfür wurde all-*trans*-Retinal in Acetonitril gelöst (15 mg in 10 ml) und 15 min mit einer Kaltlichtquelle (mit vollem Lichtspektrum) belichtet, wobei sich in einem Photogleichgewicht neben all-*trans*-Retinal und 11-*cis*-Retinal u.a. auch 13-*cis*-, 9-*cis*- und 7-*cis*-Retinal bilden. Nach Abdampfen des Acetonitrils mittels Rotationsverdampfer

wurde das Retinalgemisch in 4 ml 7 % Diethylether in Heptan aufgenommen und über eine HPLC-Säule (Reprosil, 70 Si, 5  $\mu\text{M}$ , 300 mm x 20 mm) mit 7 % Diethylether in Heptan (14 ml/min) aufgetrennt. Die 11-*cis*-Fraktion wurde aufgefangen, das Lösemittel mittels Rotationsverdampfer abgedampft und das Retinal lichtdicht bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Konzentration wurde UV/Vis-spektrometrisch in 100 % EtOH bestimmt ( $\epsilon_{380\text{ nm}}$  für 11-*cis*-Retinal =  $0,0244\text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ ).

## 4.5 Untersuchungen mittels UV-Vis-Spektrometrie

### 4.5.1 UV/Vis-Spektrum von Rhodopsin

Zur Kontrolle der Reinheit und Konzentrationsbestimmung des Rhodopsins dienen UV/Vis-Spektren (siehe Abbildung 40).



**Abbildung 40: UV/Vis-Spektren zur Konzentrationsbestimmung**

Absorptionsspektrum von Rhodopsin in Puffer E inkl. 1 % DDM & 50 mM HA vor (dk) und nach (hv; gestrichelt) Belichtung (A) sowie zugehöriges Differenzspektrum (C). Die Absorptionsänderung bei 500 nm wurde zur Konzentrationsbestimmung verwendet. Das Verhältnis der Absorption bei 280 nm und 500 nm gibt Auskunft über die Reinheit der Probe. (B) zeigt das Absorptionsspektrum von gereinigtem, zur Regeneration eingesetztem 11-*cis*-Retinal in EtOH.

Ein vollständiges UV/Vis-Spektrum von bovinem Rhodopsin zeigt fünf Absorptionsmaxima. Die Maxima bei 191 nm und 227 nm kommen hauptsächlich von den Peptidbindungen und sind nicht in Abbildung 40 dargestellt, wohingegen das Maximum bei

280 nm auf die aromatischen Seitenketten des Proteins zurückzuführen ist. Die zwei restlichen Absorptionsmaxima bei 350 nm und 500 nm liegen im visuellen Bereich und kommen von der Anwesenheit des Chromophors, dem 11-*cis*-Retinal. Dieses Vitamin-A-Aldehyd ist kovalent an die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysin<sup>296</sup> gebunden. Das  $Abs_{280}/Abs_{500}$ -Verhältnis erlaubt eine grobe Schätzung der Reinheit der zugrundeliegenden Rhodopsin-Präparation und sollte bestenfalls zwischen 1,5 und 1,8 liegen (Papermaster & Dreyer, 1974; De Grip, Daemen & Bonting, 1980).

#### 4.5.2 Konzentrationsmessung

Die Rhodopsinkonzentration kann über die Abnahme der Absorption bei 500 nm nach Belichtung bestimmt werden (siehe Abbildung 40 A & C auf Seite 113). Nach der Absorption eines Photons isomerisiert der inverse Agonist 11-*cis*-Retinal zu dem all-*trans*-Retinal, was dazu führt, dass die zwei Absorptionspeaks im visuellen Bereich verschwinden, während zwei neue Peaks bei 380 nm und 450 nm erscheinen (Wald, 1968). Um dabei entstehende, diverse Photoprodukte, die ebenfalls bei 500 nm absorbieren, zu eliminieren, wird jeweils Hydroxylamin (HA) hinzugegeben. HA konvertiert alle freien und gebundenen Retinalaldehyde in sogenanntes Retinaloxim, welches ein Absorptionsmaximum bei 365 nm hat (Hubbard, Brown & Bownds, 1971).

Für ein sauberes UV/Vis-Spektrum muss das phosphorylierte Rhodopsin mit einem Detergens solubilisiert werden, da das Signal sonst von der großen Streuung der Membranen überlagert wäre. Für die Solubilisierung sind außer SDS, was das Rhodopsin bei Raumtemperatur denaturiert, die meisten Detergenzien geeignet (De Grip et al., 1973). Für diese Arbeit wurde die Membran in 1 % DDM solubilisiert.

Über die Abnahme der Absorption bei 500 nm kann die Rhodopsinkonzentration unter Verwendung des Extinktionskoeffizienten und der Schichtdicke der Küvette ( $d = 1 \text{ cm}$ ) ermittelt werden ( $\epsilon_{500 \text{ nm}} = 0,0406 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ):

$$c [\mu\text{M}] = \frac{\Delta Abs_{500 \text{ nm}}}{0,0406 \text{ } \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot 1 \text{ cm}} \cdot \text{Verdünnung} \quad (1)$$

Zur spektrometrischen Konzentrationsbestimmung von Rhodopsin wurden die zu bestimmenden Membranen nach Solubilisierung in 1 % DDM und Zentrifugation unter Rotlicht



1 : 20 in 100 mM HA verdünnt (Endvolumen: 80 µl bis 100 µl) und photometrisch als Hintergrund vermessen (*baseline*). Die Membranprobe wurde dann für mindestens 10 s mit einer 150-W Lichtquelle (>495 nm) belichtet und ein Differenzspektrum aufgenommen. Über die Absorptionsabnahme bei 500 nm wurde die Rhodopsinkonzentration unter Verwendung von (1) ermittelt. Eine Liste aller verwendeten Extinktionskoeffizienten ist in Tabelle 11 auf Seite 146 dargestellt.

## **4.6 Molekularbiologische und biochemische Methoden**

### **4.6.1 Auftrennung von Proteinen via SDS-PAGE**

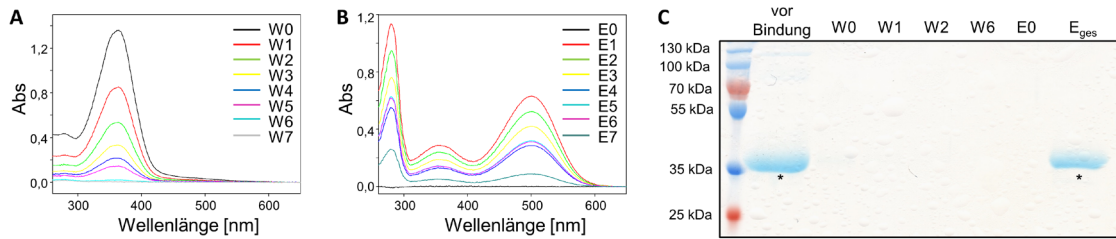
Um Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde eine Gelelektrophorese mit einer Mini-Protean®3-Kammer (Biorad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurde der Rotiphorese® 10-fach SDS-PAGE (Carl Roth) auf 1-fach SDS-Laufpuffer verdünnt und 12 %-ige Acrylamidgele genutzt. Rhodopsinlösungen wurden mit 5-fach Probenpuffer versetzt, aber nicht aufgekocht, da die Hitze dem Protein schadet. Zwischen 10 µg und 20 µg (bis zu 25 µl) wurde in die Geltaschen geladen. Als Proteingrößenstandard wurde der PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific) verwendet. Die Gelelektrophorese lief für 20 min bei 80 V (Einlaufen der Proben ins Sammelgel) und für 90 min bei 150 V (Auftrennung der Proben im Trenngel). Anschließend wurde das Gel mit der Coomassie Blue R-250-Proteinfärbelösung (Serva) nach Herstellerangaben gefärbt.

### **4.6.2 Aufreinigung mit Concanavalin A**

Rhodopsin verfügt intradiskal in der Nähe des N-Terminus‘ über zwei N-Glykosylierungen (Hargrave, 1977), welche drei Mannose- und drei N-Acetylglucosaminreste enthalten (Plantner & Kean, 1976; Fukuda, Papermaster & Hargrave, 1979). Über diese Zuckerreste kann es in Anwesenheit von  $Mn^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  an das Lektin Concanavalin A (ConA) binden (Steinemann & Stryer, 1973), sodass das solubilisiertere Rhodopsin durch wiederholtes Waschen mit Detergens von seiner Lipidumgebung getrennt werden kann (Ander-

son, Maude & Zimmerman, 1975; Stubbs & Litman, 1978). Da Opsin in Detergens denaturiert, kann mit dieser Methode auch Opsin von Rhodopsin getrennt werden (De Grip, Daemen & Bonting, 1980).

Für die ConA-Aufreinigung wurde ein Protokoll von Wilden und Kühn (1982) modifiziert: Phosphorylierte, regenerierte Diskmembranen wurden in 3,3 % (w/v) DDM, 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 10 mM HA in Puffer E für 1 h bei RT schwenkend im Dunkeln solubilisiert. Nach Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und die Konzentration spektrometrisch bestimmt. Der Überstand wurde auf eine Säule mit ConA-Sepharose 4 B (GE Healthcare), welche mit 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 % OG in Puffer E äquilibriert wurde, gegeben. Die Säule wurde mit Stopfen und Kappe verschlossen, in Alufolie eingewickelt und für 30 min schwenkend im Dunkeln bei RT inkubiert. ConA hat eine Bindungskapazität von etwa 2 mg Rho/ml, sodass das Säulenvolumen entsprechend der zuvor berechneten Rhodopsinmenge auf 1 ml bis 10 ml eingestellt wurde. Die Säule wurde fünfmal mit 1 mM  $\text{MnCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1 % (w/v) OG in Puffer E und zweimal in 0,05 % (w/v) DDM Puffer E zur Delipidierung gewaschen. Die Eluate wurden spektrometrisch vermessen und Aliquots wurden für die SDS-PAGE abgenommen. Phospholipidfreies, solubilisiertes Rhodopsin wurde mit 0,3 M bis 1 M Methyl  $\alpha$ -D-Mannopyranosid (MMP) mit 0,05 % (w/v) DDM in Puffer E für 30 min schwenkend im Dunkeln inkubiert, eluiert, spektrometrisch verfolgt, aufkonzentriert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -40 °C gelagert. Bei der Elution wurde darauf geachtet, nur Proben zu verwenden, deren  $\text{Abs}_{280 \text{ nm}}/\text{Abs}_{500 \text{ nm}}$ -Verhältnis zwischen 1,6 und 2,0 lag, um eine gleichbleibend hohe Reinheit der Probe zu gewährleisten (Plantner & Kean, 1976). Mit dieser Methode konnten bis zu 80 % des eingesetzten phosphorylierten Rhodopsins erhalten werden. Die Ergebnisse einer exemplarischen ConA-Aufreinigung sind in Abbildung 41 dargestellt.



**Abbildung 41: ConA-Aufreinigung**

(A) Spektrum der Waschfraktionen: W0 (Säulendurchfluss nach Bindung), W1 bis W5 wurde mit 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub> und 1 % OG in Puffer E, W6 bis W7 mit 0,05 % DDM-Puffer. (B) Spektrum der Elutionsfraktionen: E0 (Durchfluss nach Zugabe von 0,3 M MMP), E1 bis E3: Elution mit 0,3 M MMP; E4 bis E7: Elution mit 1 M MMP. (C) SDS-PAGE zur Überprüfung der Aufreinigung. Das Sternchen (\*) markiert pRho innerhalb des gefärbten Gels.

### 4.6.3 Isoelektrische Fokussierung

In der isoelektrischen Fokussierung (IEF) nutzt man die Migrationsunterschiede, um Proteine entsprechend ihres spezifischen isoelektrischen Punkts (IPs) in einem pH-Gradienten aufzutrennen, da sie mit Erreichen der IPs nicht mehr weiterwandern, sondern fokussieren. Hierbei kann eine Trennleistung von bis zu 0,02 pH-Einheiten erzielt werden. Durch diese hohe Auflösung können homogene Proteinproben auf Grund ihrer Unterschiede in Primärstruktur, Art und Anzahl der prosthetischen Gruppen oder posttranslationale Modifikationen wie z.B. Phosphorylierungen aufgetrennt werden (Übersicht dazu in Garfin, 1990). Eine ROS-Präparation mit anschließender Phosphorylierung durch die endogene Rhodopsinkinase führt dazu, dass sich die Rhodopsinmoleküle in unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen (d.h. Anzahl und Position der Phosphate) befinden. Mithilfe der IEF können diese gezielt aufgetrennt und charakterisiert werden (Kühn & McDowell, 1977; McDowell, Nawrocki & Hargrave, 1993; Vishnivetskiy et al., 2007). Für die horizontale Flachgel-IEF wurden zur elektrophoretischen Trennung Polyacrylamidgele verwendet, welche nach Anlegen eines elektrischen Feldes einen pH-Gradienten ausbilden. Trägt man ein Protein innerhalb dieses pH-Gradienten auf und legt ein elektrisches Feld an, migriert es in Richtung der Elektrode, welche die gegenteilige Ladung aufweist. Innerhalb der Migration nimmt das Protein dabei Protonen auf oder gibt welche ab, was dazu führt, dass sich die Nettoladung ändert und die Mobilität abnimmt, das Protein somit verlangsamt wird. Erreicht das Protein seinen IP, bei dem es nach außen

hin ungeladen vorliegt, verharnt es an diesem Punkt im Gel und wird in scharfen Banden fokussiert. Nach Auftragen des Rhodopsingemisches wandert jede Phosphorylierungspezies im elektrischen Feld jeweils nur zu dem pH-Bereich, bei welchem keine Nettoladung mehr vorliegt, was ihrem IP entspricht. Für das Ausbilden eines stabilen, linearen pH-Gradienten im elektrischen Feld wurden synthetische Trägerampholyte der Firma SERVA Electrophoresis GmbH verwendet (SERVALYT™ IP 3-7, # 2945). Diese SERVALYTE™ sind Gemische aus zwitterionischen Molekülen mit Molekulargewichten zwischen 400 Da und 1000 Da mit sehr vielen verschiedenen IPs. Proteinproben für die IEF müssen salzfrei, frei von Präzipitaten und frei von zusätzlichen geladenen Molekülen wie z.B. ionischen Detergenzien oder Phospholipiden sein. Aus diesem Grund wurden nach ROS-Präparation, Phosphorylierung und Regenerierung die negativen Phospholipide via ConA-Aufreinigung entfernt (siehe 4.4.3 auf Seite 111 & 4.6.2 auf Seite 115) und das nichtionische DDM verwendet. Sämtliche zur IEF genutzten Chemikalien und Materialien wurden von der Firma SERVA Electrophoresis GmbH bezogen. Die IEF wurde nach Herstellerangaben leicht modifiziert durchgeführt: Für einen IEF-Lauf wurde ein trockenes, foliengestütztes Blank FocusGel 24S der Größe 250 mm x 115 mm x 0,65 mm (5 % T, 3 % C; # 43412) auf die gewünschte Länge geschnitten und über Nacht in einer Lösung aus 1 % (v/v) DDM, 1 % (v/v) Glycerin und 8 % (v/v) SERVALYT™ IP 3 -7 äquilibriert. Danach wurde das Gel für 20 min an der Luft getrocknet und mit einem Filterpapier die vorgefertigten Taschen ausgetrocknet. Für die Elektrophorese wurde die Kühlplatte der IEF-Kammer auf 8 °C vorgekühlt. Je nach Größe des Gels wurden 1 ml bis 5 ml der Kühlvermittlungslösung (# 43371) in der Mitte der Kühlplatte aufgebracht. Anschließend wurde das Gel mit der Folie nach unten mit den Applikations-taschen zur Anode ausgerichtet luftblasenfrei auf die Kühlplatte gelegt. Zwei Papierelektrodenochte (# 42988) wurden an die Gellänge angepasst, mit jeweils 0,1 ml/cm Anodenflüssigkeit pH = 3 (# 42984) bzw. Kathodenlösung pH = 10 (# 42986) getränkt und auf das Gel aufgelegt (Anodendocht nach unten zur Anode ausgerichtet; Kathodendocht nach oben zur Kathode ausgerichtet). In die vorgefertigten Taschen wurden 5 µl bis 20 µl Probe einer Konzentration von 3 µg/µl bis 12 µg/µl im Dunkeln aufgetragen; zur Kontrolle wurden 5 µl des SERVA Liquid Mix IEF Markers 3-10 (# 39212) verwendet. Abhängig von der Größe des Gels wurden die Tabelle 9 aufgeführten Parameter eingestellt.

**Tabelle 9:** IEF-Laufbedingungen

<b>Taschen</b>		4	8	10	12	16	20
<b>Einwan- derung</b>	30 min	500 V	500 V	500 V	500 V	500 V	500 V
		5 mA	10 mA	13 mA	15 mA	20 mA	25 mA
		2 W	4 W	5 W	6 W	7 W	9 W
<b>Fokus- sierung</b>	1,5 h	1500 V	1500 V	1500 V	1500 V	1500 V	1500 V
		4 mA	6 mA	8 mA	9 mA	12 mA	15 mA
		4 W	7 W	9 W	10 W	14 W	17 W
<b>Banden- schärfung</b>	1 h	2000 V	2000 V	2000 V	2000 V	2000 V	2000 V
		3 mA	5 mA	7 mA	8 mA	10 mA	13 mA
		5 W	9 W	11 W	13 W	17 W	21 W

Nach der IEF wurden die aufgetrennten Proteine im Gel für 30 min mit 20 % TCA fixiert, was gleichzeitig die Ampholyte herauswäscht. Anschließend wurde das Gel erst für 5 min in ddH<sub>2</sub>O und anschließend für 30 min in Entfärbelösung (20 % EtOH, 10 % Essigsäure) schwenkend inkubiert. Danach wurde das Gel für 15 min mit der Serva Blau R-Coomassie-Färbelösung (# 35051) gefärbt, über Nacht mit der Entfärbelösung entfärbt. Zur Lagerung wurde das Gel für 5 min in 5 % Glycerin gewaschen und an der Luft getrocknet.

#### 4.6.4 Gravitations-Western-Blot

Sollte das IEF-Gel für einen Gravitations-Western-Blot genutzt werden, so wurden das Gel nach der Fokussierung für 5 min, die Nitrocellulose-Blottingmembran (Amersham<sup>TM</sup> Protran 0,45 µm NC, GE Healthcare, Life Science) und zwei zurechtgeschnittene Filterpapiere für 20 min mit Transferpuffer (50 mM Tris, pH = 8) äquilibriert. Zum Blotten wurde das Gel mit der Gelseite nach oben in eine Gelkassette gelegt. Darüber wurden die Blotmembran luftblasenfrei und die zwei äquilibrierten Filterpapiere gestapelt. Anschließend wurden zwei trockene Blotvliese darübergelegt, die Blotkammer wurde geschlossen und mit zwei Metallblöcken beschwert. Der Western-Blot erfolgte über Nacht bei RT. Im Anschluss wurde die Membran 1 h bei RT in 10 % BSA in TBS-T<sub>0,1</sub> % (10 ml 1 M Tris pH = 8, 30 ml 5 M NaCl, 960 ml ddH<sub>2</sub>O, 1 ml Tween<sup>®</sup> 20) blockiert, um unspezifische Bindungsstellen für Proteine auf der Membran zu unterbinden, und das BSA dreimal für 10 min mit TBS-T<sub>0,1</sub> % entfernt. Der monoklonale murine Primärantikörper α1D4 (University of British Columbia, #95-062) wurde 1 : 10.000 in 0,5 % BSA in TBS-T<sub>0,1</sub> % für

1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem Gel auf dem Nutator inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T<sub>0,1</sub> % bei RT für je 10 min wurde die Membran mit dem entsprechenden Sekundärantikörper sheep- $\alpha$ -mouse-IgG-HRP (1 : 10.000 in 0,5 % BSA in TBS-T<sub>0,1</sub> %) (GE-Healthcare, #RPN4201), der mit der Meerrettich-Peroxidase (HRP für *horseradish peroxidase*) gekoppelt ist, 1 : 10.000 in 0,5 % BSA in TBS-T<sub>0,1</sub> % für 1 h bei RT inkubiert. Abschließend wurde die Membran erneut dreimal in TBS-T<sub>0,1</sub> % bei RT gewaschen. Zur Visualisierung der Proteine wurde das ECL (*enhanced chemiluminescence*) Western Blotting Analysis System (GE Healthcare, # RPN2108) nach Herstellerangaben verwendet. Die Detektion der Proteine erfolgte am Amersham<sup>TM</sup> Imager 600 (GE Healthcare, Life Science).

#### **4.6.5 Präparative Trennung der pRho-Spezies**

Über eine FPCL wurden die verschieden phosphorylierten, solubilisierten Rhodopsin-Spezies nach McDowell und Kollegen (2000) abgewandelt quantitativ aufgetrennt. Hierfür wurde eine 4 ml MonoP-Säule (HR 5/20, Pharmacia) genutzt (McDowell et al., 2000). Das Säulenmaterial MonoP wurde ursprünglich als Anionenaustauscher für die Chromatofokussierung entwickelt, bei der die Proteine aufgrund ihres unterschiedlichen IPs innerhalb eines pH-Gradienten separiert werden können (Slyterman & Wijdenes, 1977, 1978 & 1981; Slyterman & Elgersson, 1978). Es handelt sich hierbei um hydrophile Kügelchen (*beads*) mit einer Partikelgröße von etwa 10  $\mu$ m, an die positiv geladenen tertiäre und quartäre Amine gekoppelt sind und die eine pH-Gradientenausbildung ermöglichen (Righetti, 1983). Für die Ausbildung dieses pH-Gradienten wird der ebenfalls von Pharmacia entwickelte Polypuffer 74 (74 für pH = 7 bis pH = 4) verwendet, welcher jedoch nicht mehr hergestellt wird. Aus diesem Grund wurde die Separation nach McDowell und Kollegen (2000) wie folgt geändert:

Die MonoP-Säule wurde zu Beginn mit entgastem Puffer G bei 4 °C äquilibriert. Phosphoryliertes, solubilisiertes, über ConA-gereinigtes, delipidiertes Rhodopsin wurde 15 min für 14 000 rpm bei 4 °C zentrifugiert, um denaturiertes Protein abzutrennen. Etwa 10 mg (10 mg/ml) wurden auf die äquilibrierte MonoP-Säule mit einer Flussrate von 0,5 ml/min aufgetragen. Danach wurden die verschieden phosphorylierten Rhodop-

sin-Spezies über einen Salzgradienten von 0 M bis 1 M NaCl in Puffer G in 1 ml Fraktionen eluiert. Die Elution wurde über die UV-Absorption bei 280 nm spektrometrisch verfolgt. Fraktionen, die bei  $A_{280\text{ nm}}$  einen Peak aufwiesen, wurden vereint, mit einem Amicon Ultra-4 Mikrokonzentrator (10 kDa Ausschlussgrenze) entsalzt, aufkonzentriert und spektrometrisch über die Absorption bei 500 nm die Konzentration bestimmt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels IEF charakterisiert, für spätere fluoreszenzspektrometrische Versuche (siehe 4.7 ab Seite 130) eingefroren und bei  $-40\text{ °C}$  gelagert.

#### **4.6.6 Extra Meta II-Messung**

Die sogenannte „Extra Meta II-Methode“ quantifiziert eine Meta II-Stabilisierung und wird genutzt, um den prozentualen Anteil phosphorylierter Rezeptoren zu bestimmen, der nicht ausreichend hochphosphoryliert vorliegt, um zugegebenes Arrestin als lichtinduziertes Meta II binden. Nach Belichtung liegt der aktive Rezeptor in einem temperatur- und pH-abhängigen Gleichgewicht zwischen Meta I ( $\lambda_{\text{max}} = 480\text{ nm}$ ) und Meta II ( $\lambda_{\text{max}} = 380\text{ nm}$ ) vor, was spektrometrisch verfolgt werden kann, da die Absorptionsmaxima sich deutlich unterscheiden (Matthews et al., 1963). Dies kann man sich zunutze machen, indem die spezifische Meta II-Bindung von Proteinen wie Transducin ( $G_t$ ) oder Arrestin dieses Gleichgewicht auf die Meta II-Seite verschieben. Man beobachtet nach einer Bindung dieser Proteine eine Zunahme der Absorption bei 380 nm. Die Verschiebung der Absorptionsmaxima von 480 nm (Meta I) auf 380 nm (Meta II) beruht auf der Deprotonierung der Schiff'schen Base und der Protonierung des Gegenions am Glu<sup>113</sup> (zusammengefasst in Hofmann et al., 2009). Allerdings kann mit dieser Methode nicht zwischen Meta IIa, Meta IIb oder Meta IIb•H<sup>+</sup> unterschieden werden. Höhere Temperaturen und ein niedriger pH-Wert führen zur verstärkten Meta II-Bildung; wohingegen bei niedrigeren Temperaturen (0 °C bis 4 °C) und basischem pH-Wert etwa 90 % Meta I und nur 10 % Meta II vorliegen (Parkes & Liebman, 1984). Nachteil der Methode ist, dass diese niedrigen Temperaturen nicht physiologisch sind und ebenfalls die physikalischen Eigenschaften der Membranen beeinflussen. Da in Detergens-solubiliertem Rhodopsin das Gleichgewicht vollständig auf Meta II-Seite verschoben ist, ist für diese Methode nur lipidgebundenes Rhodopsin nutzbar.

Für die Extra Meta II-Methode wurde ein modifiziertes Shimadzu UV3000 Zweiwellenlängen-Spektrophotometer genutzt. Um die Lichtaktivierung der Probe während der Messung zu verhindern, wurde die Anregungsspalte minimiert. Die Lichtblitzdauer wurde zur Vermeidung der Isorhodopsinbildung aus Meta I auf unter 1 ms gesetzt. Eine 2 mm Kurzpassküvette wurde für die Messungen genutzt, um Lichtstreuungsartefakte zu verhindern. Zur Vermessung nativer Diskmembranen wurde die Absorption bei 417 nm (isosbestischer Punkt des Meta I-Meta II-Gleichgewichtes) von der Absorption bei 380 nm (Meta II) abgezogen, um ebenfalls die Streuung der Membranen zu minimieren (Emeis & Hofmann, 1981).

Für eine Extra Meta II-Messung wurden jeweils 10  $\mu\text{M}$  phosphorylierte Diskmembranen in Puffer H (100 mM HEPES, pH = 8) gelöst und in eine 2 mm Kurzpassküvette überführt. Der Küvettenhalter neben der Kathode des Photomultipliers wurde mit einer Peltierkühlung auf 0 °C bis 2 °C gekühlt. Ein konstanter Luftstrom sollte eine Kondensation an der Küvette während der Messung verhindern. Die vorbereitete Probe wurde für drei Minuten im Probenhalter äquilibriert, um auf etwa 0 °C abzukühlen. Insgesamt wurden für 300 s die Absorptionen bei 380 nm und 417 nm aufgezeichnet; nach 30 s wurde die Probe wurde mit einem Photoblitz (500 nm  $\pm$  20 nm Breitbandinterferenzfilter, Blaugrünfilter (BG 24, 2 mm, Schott)) für <1 ms belichtet, der etwa 20 % der Diskmembranen aktiviert. Um nun die Phosphorylierung des Rhodopsins in Diskmembranen zu charakterisieren, wurden 10  $\mu\text{M}$  phosphorylierte Diskmembranen allein (Negativkontrolle), mit 10,5  $\mu\text{M}$  Arrestin WT und 300  $\mu\text{M}$  hochaffinem C-terminalen Peptidanalogen der  $\alpha$ -Transducin-Untereinheit ( $G_i$ -HAA, ILENLKDCGLF, maximales Signal) jeweils in Puffer H vermessen. Das verwendete  $G_i$ -HAA ergab mit den 10  $\mu\text{M}$  Diskmembranen das maximale ( $\text{Abs}_{380\text{ nm}} - \text{Abs}_{417\text{ nm}}$ )-Signal für die verwendeten Diskmembranen. Zur Auswertung wurde die Änderung der Absorption  $\Delta\text{Abs}_{380\text{ nm} - 417\text{ nm}}$  über die Zeit aufgetragen und die prozentuale Phosphorylierung der jeweiligen Diskmembranen-Präparation bestimmt.

#### **4.6.7 Proteolyse mit Asp-N**

Der phosphorylierte C-Terminus von Rhodopsin wurde mit der Endopeptidase Asp-N (MERCK Millipore, aus *Pseudomonas fragi*, #324708) proteolytisch gespalten, die die



Peptidbindung N-terminal nach Asp-Resten schneidet. Für das Membranprotein Rhodopsin bedeutet dies, dass direkt vor den möglichen phosphorylierten Aminosäureresten innerhalb des C-Terminus‘ an Asp<sup>330</sup> oder Asp<sup>331</sup> geschnitten wird, somit das C-terminuslose, trunkierte Rhodopsin (<sup>329</sup>Gly-Rho) zurückbleibt und keine Phosphorylierung mehr aufweist. Hierfür wurden 5 µM phosphoryliertes Rhodopsin in Diskmembranen im Dunkeln mit Asp-N im Verhältnis 1:750 bzw. 1:500 in 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5 versetzt und zwischen 1 h bis 6 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln (120 rpm) inkubiert. Durch anschließendes dreimaliges Waschen und Zentrifugation (14.000 rpm, 10 min, 20 °C) konnte der Überstand mit dem abgespaltenen, phosphorylierten C-Terminus und der Asp-N vom trunkierten Rhodopsin (Pellet) abgetrennt und in einem neuen Puffer aufgenommen werden. Die Proteolyse wurde über SDS-Gelelektrophorese und Extra Meta II-Messung quantifiziert.

#### **4.6.8 Dephosphorylierung mit AP**

Zum Dephosphorylieren der über ConA gereinigten, phosphorylierten Rhodopsinproben wurde die Alkalische Phosphatase (AP) von Roche (#713023) nach Herstellerangaben verwendet. Für den ersten Dephosphorylierungsversuch wurden 20 U AP in zehnfach Dephospho-Puffer (mitgeliefert) und 2 mM MgCl<sub>2</sub> mit 40 µg gereinigtem, phosphoryliertem Rhodopsin versetzt und bei 30 °C für verschiedene Zeitspannen inkubiert. Für weitere Dephosphorylierungsversuche reduzierte sich die AP-Einsatzmenge auf 0,7 U bzw. 0,4 U. Das Abstoppen der Phosphatase erfolgte mit 50 mM EDTA. Anschließend wurde der Ansatz zum Entsalzen dreimal mit Puffer E in 0,05 % DDM gewaschen und aufkonzentriert (Amicon-Ultra 0.5 Mikrokonzentration mit Ausschlussgröße 10 kDa), aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei –40 °C gelagert und nach Bedarf weiterverwendet.

#### **4.6.9 Dephosphorylierung mit PP2A**

Zum Dephosphorylieren der über ConA gereinigten, phosphorylierten Rhodopsinproben wurde die humane, rekombinant hergestellte Protein Phosphatase 2 A γ-Untereinheit von Cayman Chemical Company (#10011237, Batchnr. 0492064) nach Herstellerangaben

verwendet. Zur Dephosphorylierung mit PP2A wurden 2,7 mU mit 34 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 mM EDTA und 2 mM DTT in 50 mM HEPES pH = 7,5 mit 40 µg gereinigtem, phosphoryliertem Rhodopsin versetzt und bei 30 °C für verschiedene Zeitspannen inkubiert. Das Abstoppen der Phosphatase erfolgte mit 1 µM Okadasäure (Abcam, #ab120375), einem spezifischen Inhibitor für die Serin-/Threonin Protein Phosphatase 2A. Danach wurde der Ansatz dreimal mit Puffer E in 0,05 % DDM gewaschen und aufkonzentriert (Amicon-Ultra 0.5 Mikrokonzentrator mit Ausschlussgröße 10 kDa), aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren, bei –40 °C gelagert.

#### 4.6.10 DOPA-Präparation

Für die gemischte Mizellenbildung der über ConA gereinigten, phosphorylierten Rhodopsin-Präparationen wurde negativ geladenes Phospholipid für die Ausbildung der Arrestinbindung verwendet. Hierfür wurde 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphat als Mononatriumsalz (DOPA, siehe Abbildung 42) von Avanti Polar Lipids verwendet, welches bei –20 °C gelagert wird.

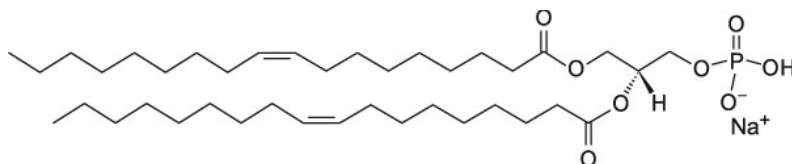


Abbildung 42: DOPA-Struktur

2,5 ml DOPA/Chloroform-Lösung wurden in ein kleines Glasgefäß mit Stopfen überführt und das Chloroform mit kontinuierlichem Argongasfluss unter dem Abzug so lange evaporiert, bis nur ein leichter Film am Rand übrigblieb. Für eine 5 mM DOPA/ 1 % DDM-Lösung wurden 6,916 ml Puffer E zu 1 % DDM gegeben. Das Glasgefäß wurde mit Argongas gefüllt, mit einem Stopfen und Parafilm verschlossen, um die Oxidation der Doppelbindungen zu verhindern. Die Suspension wurde leicht gemischt, bei 40 °C für 10 min inkubiert und anschließend bei –40 °C für mehr als 20 min eingefroren. Dieser Einfrier-Auftau-Zyklus wurde so oft wiederholt, bis die Phospholipide komplett resuspendiert waren. Vor der Aliquotierung wurde die Suspension für 10 s sonifiziert und anschließend bei –40 °C bis zur Verwendung gelagert.

#### 4.6.11 Ölsäure-Präparation

Für die definierte Mizellenbildung wurde die Ölsäure (Sigma Aldrich, #O1008, siehe Abbildung 43) als einfach ungesättigte Fettsäure analysiert.

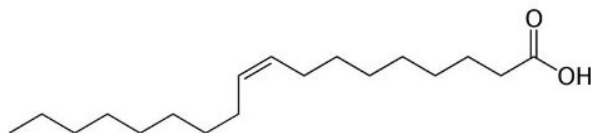


Abbildung 43: Ölsäure-Struktur

Eine Ausgangslösung von 100 mM in 100 % EtOH wurde angesetzt. Zur Bestimmung der geeigneten Einsatzmenge von Ölsäure für die fluoreszenzbasierten Titrationsbindungsanalysen wurden 2  $\mu$ M pRho in Puffer F mit 1  $\mu$ M Arr I72B versetzt und die Fluoreszenz gemessen (siehe 4.7 ab Seite 130), während mit 0  $\mu$ M bis 500  $\mu$ M Ölsäure titriert wurde.

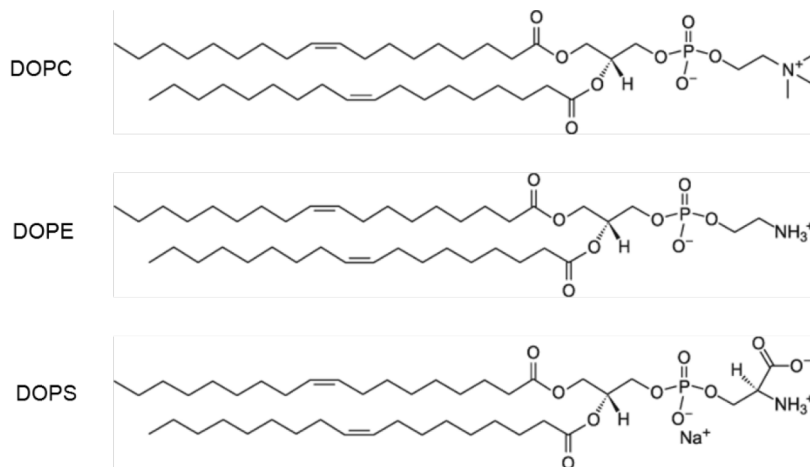
#### 4.6.12 Asolectin-Präparation

Für die gemischte Mizellenbildung der gereinigten, phosphorylierten Rhodopsin-Präparationen wurde Asolectin (Sigma Aldrich, #1145) aus der Sojabohne verwendet (Sommer & Farrens, 2006). Asolectin beinhaltet eine Mischung aus natürlichen, mehrfach ungesättigten Phospholipiden, welche zu etwa 25 % aus Phosphatidylcholin gebildet werden, und kann ebenfalls zur Rekonstitution von solubilisiertem, gereinigtem Rhodopsin genutzt werden. Um eine Ausgangslösung von 1 % Asolectin in 1 % DDM herzustellen, wurden 0,01 g Asolectin in 1 ml 1 % DDM gelöst, zum Vermischen über eine Kanüle mit Nadel auf- und abpipettiert und anschließend 20 min bei 60.000 rpm, 4 °C abzentrifugiert. Für fluoreszenzbasierte Titrationsanalysen wurden 0,02 % Asolectin in 0,02 % DDM verwendet (Sommer & Farrens, 2006).

#### 4.6.13 Lipidemix-Präparation

Zur Rekonstitution von gereinigtem Rhodopsin wurde ein Lipidemix aus Phospholipiden verwendet (Sommer et al., 2006, siehe Abbildung 44), welcher sich wie folgt zusammensetzt: 40 % Phosphatidylcholin (DOPC, Avanti #850375), 40 % Phosphatidylethanolamin (DOPE, Avanti #850725) & 20 % Phosphatidylserin (DOPS, Avanti # 840035).

Für 5 mM Lipidemix in 1 % DDM wurden 2 mM DOPC, 2 mM DOPE und 1 mM DOPS vermischt und das Chloroform, in welchem die Lipide gelöst waren, unter dem Abzug mit kontinuierlichem Argongasfluss so lange evaporiert, bis nur ein leichter Fettfilm an der Gefäßwand übrigblieb. Anschließend wurde 1 % DDM hinzugegeben, das Gefäß mit Argon überschichtet, um Oxidationen zu verhindern, und mit Parafilm versiegelt. Die Suspension wurde zum Lösen der Lipide gemischt, 10 min im Wasserbad bei 40 °C und anschließend 20 min bei –20 °C im Gefrierfach inkubiert. Dieser Einfrier-Auftau-Zyklus wurde so oft wiederholt, bis die Phospholipide komplett resuspendiert waren. Vor der Aliquotierung wurde die Suspension für 10 s sonifiziert und anschließend bei –40 °C bis zur Verwendung gelagert.



**Abbildung 44: Lipidemix-Zusammensetzung**

Der Lipidemix setzt sich 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholin (DOPC), 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphoethanolamin (DOPE) und 1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phospho-L-Serin (DOPS) zusammen.

#### **4.6.14 Arrestinmutationen**

In dieser Arbeit wurden folgende Arrestinmutationen genutzt: I72C, S344C sowie die Doppelmutation I299C/L173W.

#### **4.6.15 Expression und Aufreinigung von Arrestin**

Sämtliche Expressionen und Aufreinigungen der Arrestinmutanten, die für diese Arbeit verwendet wurden, wurden von Brian Bauer durchgeführt. Das in dieser Arbeit verwendete und als Wildtyp (WT) bezeichnete Arrestinkonstrukt stammt ursprünglich aus bovinem Arrestin, welchem alle nativen Cystein- und Tryptophanreste (C63A, C128S, C143F, W194F) fehlen. Es wurde in einen pET15b-Vektor kloniert. Einzelne, definierte Reste innerhalb dieser Arrestinvariation wurden wiederum in Cysteine mutiert, um gezielte Bereiche mit Fluorophoren für spätere Fluoreszenzmessungen markieren (*labeln*) zu können. Diese Mutationen wurden mittels Polymerasekettenreaktion eingeführt; die Primer dafür wurden von Sigma-Aldrich bezogen und durch Sequenzierung (LGC genomics) verifiziert. Die entsprechende Plasmid-DNA zu den Arrestinvariationen wurde in superkompetenten *E.coli* XL1-Blue-Zellen (Stratagene) exprimiert und mittels sogenannter Miniprep Kits (ThermoFisher Scientific) isoliert. Für die Proteinexpression wurden kompetente *E.coli* BL21-(DE3)-Zellen (New England BioLabs) mit der isolierten Plasmid-DNA transformiert und auf LB-Ampicillin-Platten ausplattiert. Eine Kolonie davon wurde zum Animpfen von 5 ml LB-Mediums inkl. 100 µg/ml Ampicillin verwendet. Nach achtstündiger Inkubationszeit bei 28 °C unter Schütteln (140 rpm) wurden vier 2 l Hauptkulturen in LB-Medium mit Ampicillin mit je 32 ml dieser Vorkultur angeimpft. Diese Hauptkultur wurde über Nacht bei 28 °C schüttelnd (140 rpm) inkubiert (14 h bis 16 h). Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit 30 µM IPTG (Carl Roth) induziert, für sechs Stunden bei 28 °C inkubiert (140 rpm) und durch Zentrifugation (6500 rpm, 15 min, 4 °C) geerntet. Die Pellets wurden anschließend in Puffer I (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH = 7) resuspendiert und in 150 ml Gefäße überführt. Nach der Zugabe von 100 mg/ml Lysozym (Fluka Analytics, #62971) wurden die Gefäße geschwenkt, 30 min auf Eis inkubiert und über Nacht bei -40 °C weggefroren. Am nächs-

ten Tag wurde die Zellsuspension unter fließend kaltem Wasser aufgetaut. Nach der Zugabe von 1 ml DNase II (Sigma-Aldrich, #D8764) und 200 µl 1 M MgCl<sub>2</sub> erfolgte der Zellaufschluss mittels Microfluidizers und Zentrifugation des Zelllysates (18.000 rpm, 60 min, 4 °C). Nach Fällung mit 0,32 g/ml Ammoniumsulfat zur Proteinpräzipitation und Zentrifugation (15.000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde das Pellet in Puffer J (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH = 7) resuspendiert und mit 5 mM DTT versetzt. Nach anschließender Zentrifugation (18.000 rpm, 30 min, 4 °C) wurde der Überstand durch einen 0,8 mm Zellosefilter zum Abtrennen von unlöslichen Bestandteilen gefiltert und mit 2 ml/min in einem 1 : 3 Verhältnis mit Puffer I auf eine 3-fach 5 ml HiTrap Heparinsäule (GE Healthcare) aufgetragen. Waschen und Elution des Arrestins erfolgte mit 300 ml eines linearen Gradienten von 0,1 M bis 0,5 M NaCl bei 2 ml/min. Anschließend wurde die Säule mit Puffer K (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, pH = 7) gewaschen. Fraktionen, die Arrestin enthielten, wurden über SDS-PAGE mittels 12 %-iger Gele bestimmt, vereint, filtriert (1,2 µm Porengröße) und auf eine 5-ml-HiTrap-SP-HiTrap-Q-Säule 1 : 10 verdünnt in Puffer I aufgetragen (2 ml/min). Die Säule wurde mit 25 ml Puffer I gewaschen und die Arrestinelution erfolgte mit einem Salzgradienten von 0 M bis 0,3 M NaCl. Über SDS-PAGE wurden die Fraktionen, die Arrestin enthielten, bestimmt (12 %-ige Gele). Diese wurden vereint, mit 5 mM DTT versetzt und aufkonzentriert (Amicon-Ultra 0.5 Mikrokonzentrator mit Ausschlussgröße 10 kDa). Zum Entfernen des DTTs wurde die Arrestinlösung mit Puffer F gewaschen (Amicon-Ultra 0.5 Mikrokonzentrator mit Ausschlussgröße 10 kDa). Über die Absorption bei 278 nm wurde die Proteinkonzentration bestimmt (Sommer et al., 2005). Nach dem Aliquotieren wurde das aufgereinigte Protein in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –40 °C bis zur Verwendung gelagert.

#### **4.6.16 Fluoreszenzmarkierung von Arrestin**

Für fluoreszenzspektrometrische Messungen wurden die unter 4.6.14 auf Seite 127 erwähnten Arrestinmutanten mit den Fluorophoren Monobromobimane (Bimane, B; Molecular Probes, Thermofisher Scientific) und *N,N'*-Dimethyl-*N*-(Iodoacetyl)-*N'*-(7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazol-4-yl)Ethylendiamin (IANBD, NBD; Molecular Probes,

ThermoFisher Scientific) über dafür selektiv eingeführte reaktive Thiolgruppen verknüpft. Um eine übersichtliche Nomenklatur zu erhalten, wurde der Fluorophor in der Benennung an die Stelle des zuvor eingefügten Cysteins gesetzt, sodass Arr I299C/L173W nach dem Markieren mit Bimane in Arr I299B/L173W umbenannt wurde. Ebenso wurden Arr I72C bzw. ArrS344C nach der Markierung mit NBD entsprechend Arr I72NBD bzw. Arr S344NBD genannt. Beide Fluorophore zeigen signifikante Änderungen im Emissionsspektrum, wenn Arrestin an einen phosphorylierten Rezeptor bindet (Sommer, et al., 2011; 2012; Lally & Sommer, 2015).

Zunächst wurden die Fluorophore in DMSO gelöst. Nach Verdünnung in EtOH unter Verwendung der entsprechenden Extinktionskoeffizienten (B:  $\epsilon_{380\text{ nm}} = 0,005\text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ; NBD:  $\epsilon_{500\text{ nm}} = 0,025\text{ }\mu\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) wurde spektrometrisch die Konzentration bestimmt. Ebenso wurde die Konzentration der Arrestinmutanten auf 50  $\mu\text{M}$  mit isotonem Puffer F (50 mM HEPES, 130 mM NaCl, pH = 7) eingestellt. Dazu wurde der fünf- bis zehnfache molare Überschuss an Fluorophor hinzugeben, leicht gemischt und für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Die Fluorophorzugabe wurde zweimal für je 1 h bei RT und einmal bei 4 °C über Nacht wiederholt. Anschließend wurde der überschüssige, freie Fluorophor unter Verwendung der Amicon-Ultra 0.5 Mikrokonzentratoren (Ausschlussgröße 10 kDa) dreimal mit Puffer F zentrifugiert (5 min, 14.000 rpm, 4 °C) sowie über eine Größenausschlusschromatographie mit 1 ml G-15 Sephadex-Säule gereinigt. Die aufgefängenen Fraktionen wurden spektrometrisch vermessen, die Konzentrationen ermittelt, ggf. aufkonzentriert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -40 °C gelagert. Zur die Konzentrationsbestimmung von mit Bimane verknüpftem Arrestin wurde die Differenz aus ( $\text{Abs}_{280\text{ nm}} - \text{Abs}_{380\text{ nm}}$ ) genutzt. Vor der Verwendung der markierten Arrestinmutanten wurde das aufgetaute Aliquot zentrifugiert (60.000 rpm, 20 min, 4 °C), um ausgefallenes Protein abzutrennen.

## **4.7 Untersuchungen mittels Fluoreszenzspektroskopie**

Sämtliche Fluoreszenzmessungen wurden am SPEX Fluorolog 1680 bei 20 °C durchgeführt. Die Anregungsspalte hierfür wurden auf 0,1 nm bis 0,5 nm gesetzt, um eine Rezeptoranregung über das Anregungslicht zu minimieren, und die Emissionsspalte wurden auf 4 nm gesetzt.

### **4.7.1 Stationäre Fluoreszenzspektroskopie**

Für stationäre Fluoreszenzmessungen (*steady state fluorescence*) wurden folgende Parameter verwendet: Fluorophormarkierte Arrestinmutanten wurden bei 400 nm (Bimane) bzw. 360 nm (NBD) angeregt und die Emission von 424 nm bis 600 nm (Bimane) bzw. von 490 nm bis 670 nm (NBD) detektiert (2 nm Schritte, 0,5 s Integration pro Punkt). Hierfür wurde ein Spektrum im Dunkeln sowie eines nach 10 s Belichtung der Probe (150 W Lichtquelle mit >495 nm-Langpassfilter) aufgenommen. Für die Messungen wurde eine Quarzküvette (0,3 mm Weglänge, 100 µl Volumen) verwendet.

### **4.7.2 Zeitbasierte Fluoreszenzspektroskopie**

Für zeitbasierte Fluoreszenzmessungen (*time-based fluorescence measurements*) wurden folgende Parameter verwendet: Fluorophormarkierte Arrestinmutanten wurden bei 400 nm (Bimane) oder 360 nm (NBD) angeregt und die Emission wurde bei 467 nm (Bimane) oder 550 nm (NBD) für 100 s bis 300 s detektiert (2 nm Schritte, 0,5 s Integration pro Punkt). Nach 10 s bis 20 s der Messung im Dunkeln wurden die Proben während der kontinuierlichen Fluoreszenzmessung für 10 s belichtet (150 W Lichtquelle mit >495 nm-Langpassfilter) und die Fluoreszenzemission bis zum Erreichen eines stabilen gesättigten Signals gemessen. Für alle Messungen wurde eine Quarzküvette (0,3 mm Weglänge (d), 100 µl Volumen) verwendet. NaCl-Titrationen wurden in einer großen Quarzküvette (1 ml Volumen) unter ständigem Rühren (mit Magnetrührfisch) durchgeführt.



#### 4.7.3 Arrestintitrationen

Die über FPLC aufgetrennten, unterschiedlich phosphorylierten, gereinigten Rhodopsin-Spezies wurden mit einem Gemisch aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphat (DOPA) und DDM bei RT für mindestens 30 min inkubiert, um Mizellen zu formen und dann zu verschiedenen Arrestinkonzentrationen verschiedener zuvor fluorophormarkierten Arrestinmutanten gegeben. Bei dem eingesetzten DOPA (Avanti Polar Lipids) handelt es sich um ein negativ geladenes Phospholipid, welches für die Ausbildung einer Arrestin-Rhodopsin-Bindung notwendig ist.

Bei den Fluoreszenzmessungen wurden die Proben zunächst im Dunkeln und anschließend nach Belichtung vermessen, um den Einfluss verschiedener Phosphorylierungszustände, die zuvor mittels IEF überprüft wurden, auf die Arrestinbindung, Bindungskinetik und Stöchiometrie zu untersuchen. Hierfür wurden 2  $\mu\text{M}$  phosphorylierter, gereinigter Rhodopsin-Spezies mit 0,5 mM DOPA/ 0,1 % DDM in isotonem Puffer F verwendet und 0  $\mu\text{M}$  bis 6  $\mu\text{M}$  oder 10  $\mu\text{M}$  der jeweiligen Arrestinmutante bei 20 °C titriert. Zur Auswertung der Daten wurde die Software SigmaPlot 13.0 genutzt. Bei den stationären Fluoreszenzmessungen (*steady state fluorescence measurements*) wurde zunächst die Fläche unter den Kurven integriert, um einen Gesamtfluoreszenzwert zu erhalten. Bei den zeit aufgelösten Fluoreszenzmessungen wurde der Mittelwert aus den stabilen Fluoreszenzwerten vor und nach Belichtung berechnet. Nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz wurde die Änderung der Fluoreszenz ( $\Delta F = F_{\text{lichtaktiviert}} - F_{\text{dunkel}}$ ) gegen die gemessene Arrestinkonzentration aufgetragen und eine Bindungskurve berechnet (siehe 4.7.5 ab Seite 132).

#### 4.7.4 Rezeptortitrationen

Die über FPLC aufgetrennten, unterschiedlich phosphorylierten, gereinigten Rhodopsin-Spezies wurden mit einem Gemisch aus 1,2-Dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphat (DOPA, Avanti Polar Lipids) und DDM bei RT für mindestens 30 min inkubiert, um Mizellen zu formen und dann zu verschiedenen Arrestinkonzentrationen verschiedener zuvor fluorophormarkierten Arrestinmutanten gegeben. Für die Titrationen wurde die Arrestinmutante S344NBD verwendet. Bei den Fluoreszenzmessungen wurden die Proben zunächst

im Dunkeln und anschließend nach Belichtung vermessen, um den Einfluss verschiedener Phosphorylierungszustände, die zuvor mittels IEF überprüft wurden, auf die Arrestinbindung und Stöchiometrie zu untersuchen. Hierfür wurden 2  $\mu\text{M}$  Arrestin S344NBD mit 0,5 mM DOPA/ 0,1 % DDM in isotonem Puffer F verwendet und 0  $\mu\text{M}$  bis 12  $\mu\text{M}$  der jeweiligen phosphorylierten, gereinigten Rhodopsin-Spezies (aus RS25) bei 20 °C titriert. Zusätzlich wurden für jede pRho-Spezies eine maximale Konzentration der Fluoreszenzänderung abgeschätzt und in diese Proben die zusätzliche DDM-Menge gegeben, die theoretisch maximal nach Aufkonzentration und Umpufferung in 6/7-P-Proben enthalten sein könnte, um den Einfluss von hohen DDM-Mengen auf die Fluoreszenzmessungen zu untersuchen (siehe Abbildung 35 auf Seite 77). Zur Auswertung der Daten wurde die Software SigmaPlot 13.0 genutzt. Hierbei wurde der Mittelwert aus den stabilen Fluoreszenzwerten vor und nach Belichtung berechnet. Nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz wurde die Änderung der Fluoreszenz ( $\Delta F = F_{\text{lichtaktiviert}} - F_{\text{dunkel}}$ ) gegen die gemessene Arrestinkonzentration aufgetragen und die Bindungsstöchiometrie anhand des Maximums der Fluoreszenzänderung (Scheitelpunkt der Kurve) abgeschätzt.

#### 4.7.5 Mathematische Analyse der Titrationskurven

Die bei den Titrations erhaltenen Datenpunkte wurden an eine Bindungskurve angepasst, die aus der Definition der Dissoziationskonstante  $K_D$  aus dem Massenwirkungsgesetz abgeleitet wurde (Sommer, Hofmann & Heck, 2011):

$$[R] + [A] = [RA] \quad (2)$$

$$K_D = \frac{[R][A]}{[RA]} \quad (3)$$

Dabei ist

- [A] die Konzentration des freien Arrestins;
- [R] die Konzentration des freien Rezeptors;
- [RA] die Konzentration des Rezeptor-Arrestin-Komplexes.

Somit berechnen sich die gesamte Arrestin[A]<sub>t</sub>- und die gesamte Rezeptorkonzentration [R]<sub>t</sub> wie folgt:

$$[A]_t = [A] + [RA] \quad (4)$$

und

$$[R]_t = [R] + [RA] \quad (5)$$

Nach Auflösen der Formeln (4) und (5) nach  $[A]$  bzw.  $[R]$  und Einsetzen in Gleichung (3), erhält man:

$$K_D = \frac{([A]_t - [RA])([R]_t - [RA])}{[RA]} \quad (6)$$

Unter Verwendung von (6) und Lösung der quadratischen Gleichung mittels PQ-Formel lässt sich die Konzentration von  $[RA]$  als Funktion von  $[A]_t$  und  $[R]_t$  bestimmen:

$$[RA] = j + \left[ a \frac{(K_D + [A]_t + [R]_t) - \sqrt{(K_D + [A]_t + [R]_t)^2 - 4([A]_t[R]_t)}}{2} \right] \quad (7)$$

Die Faktoren  $j$  und  $a$  werden benötigt, um die Bindungskurve auf die experimentellen Daten zu skalieren. Ebenso ist die Stöchiometrie der Rezeptor-Arrestin-Bindung aus den nach (7) berechneten Titrationsdaten bestimmbar. Für die Berechnung der Titrationspunkte wurde die nonlineare Regression des Programms SigmaPlot 13.0 verwendet.

## 5 Literaturverzeichnis

- Adamus, G., Arendt, A., Hargrave, P.A., Heyduk, T., Palczewski, K. (1993). The kinetics of multiphosphorylation of rhodopsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **304**, 443-447.
- Adamus, G., Zam, S.Z., McDowell, J.H., Shaw, G.P. & Hargrave, P.A. (1988). A monoclonal antibody specific for the phosphorylated epitope of rhodopsin: comparison with other anti-phosphoprotein antibodies. *Hybridoma*, **7**, 237-247.
- Ahamed, T., Nfor, B.K., Verhaert, P.D.E.M., van Dedem, G.W.K., van der Wielen, L.A.M., Eppink, M.H.M., van de Sandt, E.J.A.X., Ottens, M. (2007). pH-gradient ion-exchange chromatography: An analytical tool for design and optimization of protein separations. *Journal of Chromatography A*, **1164**, 181-188.
- Andersen, T., Pepaj, M., Trones, R., Lundanes, E., Greibrokk, T. (2004). Isoelectric point separation of proteins by capillary pH-gradient ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1025**, 217-226.
- Anderson, R.E., Maude, M.B., Zimmerman, W. (1975). Lipids of ocular tissues-X. Lipid composition of subcellular fractions of bovine retina. *Vision research*, **5**, 1087-1090.
- Azevedo, A.W., Doan, T., Moaven, H., Sokal, I., Baameur, F., Vishnivetskiy, S.A., Homan, K.T., Tesmer, J.J., Gurevich, V.V., Chen, J., Rieke, F. (2015). C-terminal threonines and serines play distinct roles in the desensitization of rhodopsin, a G protein-coupled receptor. *eLife*, **4**, 1-22.
- Baehr, W., Devlin, M.J., Applebury, M. L. (1979). Isolation and characterization of cGMP phosphodiesterase from bovine rod outer segments. *The Journal of biological chemistry*, **254**, 11669-11677.
- Bayburt, T.H., Leitz, A.J., Xie, G., Oprian, D.D., Sligar, S.G. (2007). Transducin activation by nanoscale lipid bilayers containing one and two rhodopsins. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 14875-14881.
- Bayburt, T.H., Vishnivetskiy, S.A., McLean, M.A., Morizumi, T., Huang, C.C., Tesmer, J.J., Ernst, O.P., Sligar, S.G., Gurevich, V.V. (2011). Monomeric rhodopsin is sufficient for normal rhodopsin kinase (GRK1) phosphorylation and arrestin-1 binding. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 1420-1428.
- Berry, J., Frederiksen, R., Yao, Y., Nymark, S., Chen, J., Cornwall, C. (2016). Effect of Rhodopsin Phosphorylation on Dark Adaptation in Mouse Rods. *Journal of Neuroscience*, **36**, 6973-6987.
- Beyrière, F. (2015). Spectroscopic and microscopic analysis of arrestin-rhodopsin interactions. *Dissertation, Technische Universität Berlin*.
- Beyrière, F., Sommer, M.E., Szczepek, M., Bartl, F.J., Hofmann, K.P., Heck, M., Ritter, E. (2015). Formation and decay of the arrestin·rhodopsin complex in native disc membranes. *The Journal of biological chemistry*, **290**, 12919-12928.
- Bownds, D. (1967). Site of attachment of retinal in rhodopsin. *Nature*, **216**, 1178-1181.
- Brunette, A.M., Sinha, A., David, L.L., Farrens, D.L. (2016). Evidence that the Rhodopsin Kinase (GRK1) N-terminus and the Transducin Galpha C-terminus interact with the Same “Hydrophobic Patch” on Rhodopsin TM5. *Biochemistry*, **55**, 3123-3135.
- Butcher, A.J., Prihandoko, R., Kong, K.C., McWilliams, P., Edwards, J.M., Bottrill, A., Mistry, S., Tobin, A.B. (2011). Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *Journal of Biological Chemistry*, **286**, 11506-11518.
- Buzhynskyy, N., Salesse, C., Scheuring, S. (2011). Rhodopsin is spatially heterogeneously distributed in rod outer segment disk membranes. *Journal of molecular recognition*, **24**, 483-489.
- Calvert, P.D., Strissel, K.J., Schiesser, W.E., Pugh, E.N., Jr., Arshavsky, V.Y. (2006). Light-driven translocation of signaling proteins in vertebrate photoreceptors. *Trends in cell biology*, **16**, 560-568.

- Catty, P., Pfister, C., Bruckert, F., Deterre, P. (1992). The cGMP phosphodiesterase-transducin complex of retinal rods. Membrane binding and subunits interactions. *The Journal of biological chemistry*, **267**, 19489-19493.
- Chabre, M., Cone, R., Saibil, H. (2003). Biophysics: is rhodopsin dimeric in native retinal rods? *Nature*, **426**, 30-31.
- Cooper, N., Liu, L., Yoshida, A., Pozdnyakov, N., Margulis, A., Sitaramayya, A. (1995). The bovine rod outer segment guanylate cyclase, ROS-GC, is present in both outer segment and synaptic layers of the retina. *Journal of Molecular Neuroscience*, **6**, 211-222.
- De Grip, W.J. (1982). Purification of bovine rhodopsin over concanavalin A--sepharose. *Methods in enzymology*, **81**, 197-207.
- De Grip, W.J., van de Laar, G.L.M., Daemen, F.J.M., Bonting, S.L. (1973). Biochemical aspects of the visual process. 23. Sulfhydryl groups and rhodopsin photolysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, **325**, 315-322.
- De Grip, W.J., Daemen, F.J.M., Bonting, S.L. (1980). Isolation and purification of bovine rhodopsin. *Methods in enzymology*, **67**, 301-320.
- Ernst, O.P., Gramse, V., Kolbe, M., Hofmann, K.P., Heck, M. (2007). Monomeric G protein-coupled receptor rhodopsin in solution activates its G protein transducin at the diffusion limit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 10859-10864.
- Filipek, S., Stenkamp, R.E., Teller, D.C., Palczewski, K. (2003). G protein-coupled receptor rhodopsin: a prospectus. *Annual review of physiology*, **65**, 851-879.
- Fotiadis, D., Liang, Y., Filipek, S., Saperstein, D.A., Engel, A., Palczewski, K. (2003). Atomic-force microscopy: Rhodopsin dimers in native disc membranes. *Nature*, **421**, 127-128.
- Fowles, C., Akhtar, M., Cohen, P. (1989). Interplay of phosphorylation and dephosphorylation in vision: protein phosphatases of bovine rod outer segments. *Biochemistry*, **28**, 9385-9391.
- Fu, Y. Yau, K.W. (2007). Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, **454**, 805-819.
- Fukuda, M.N., Papermaster, D.S., Hargrave, P.A. (1979). Rhodopsin carbohydrate. Structure of small oligosaccharides attached at two sites near the NH<sub>2</sub> terminus. *The Journal of biological chemistry*, **254**, 8201-8207.
- Fukada, Y., Takao, T., Ohguro, H., Yoshizawa, T., Akino, T., Shimonishi, Y. (1990). Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature*, **346**, 658-660.
- Garfin, D.E. (1990). Isoelectric focusing. *Methods in enzymology*, **182**, 459-477.
- Garwin, G.G., Saari, J.C. (2000). High-performance liquid chromatography analysis of visual cycle retinoids. *Methods in enzymology*, **316**, 313-324.
- Gibson, S.K., Parkes, J.H., Liebman, P.A. (2000). Phosphorylation modulates the affinity of light-activated rhodopsin for G protein and arrestin. *Biochemistry*, **39**, 5738-5749.
- Gilliam, J.C., Chang, J.T., Sandoval, I.M., Zhang, Y., Li, T., Pittler, S.J., Chiu, W., Wensel, T.G. (2012). Three-dimensional architecture of the rod sensory cilium and its disruption in retinal neurodegeneration. *Cell*, **151**, 1029-1041.
- Giusto, N.M., Pasquare, S.J., Salvador, G.A., Castagnet, P.I., Roque, M.E., Illicheta de Boscherio, M.G. (2000). Lipid metabolism in vertebrate retinal rod outer segments. *Progress in lipid research*, **39**, 315-391.
- Gramage, E., Li, J., Hitchcock, P. (2014). The expression and function of midkine in the vertebrate retina. *British journal of pharmacology*, **171**, 913-923.
- Granzin, J., Wilden, U., Choe, H.W., Labahn, J., Krafft, B., Buldt, G. (1998). X-ray crystal structure of arrestin from bovine rod outer segments. *Nature*, **391**, 918-921.
- Gunkel, M., Schöneberg, J., Alkhaldi, W., Irsen, S., Noe, F. Kaupp, U. B., Al-Amoudi, A. (2015). Higher-Order Architecture of Rhodopsin in Intact Photoreceptors and Its Implication for Phototransduction Kinetics. *Structure*, **23**, 1-11.

- Gurevich, V.V., Benovic, J.L.** (1993). Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *Journal of Biological Chemistry*, **268**, 11628-11638.
- Gurevich, V.V., Benovic, J.L.** (1995). Visual arrestin binding to rhodopsin. Diverse functional roles of positively charged residues within the phosphorylation-recognition region of arrestin. *Journal of Biological Chemistry*, **270**, 6010-6016.
- Gurevich, E.V., Gurevich, V.V.** (2006). Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biology*, **7**: 236.
- Gurevich, V.V., Gurevich, E.V.** (2004). The molecular acrobatics of arrestin activation. *TRENDS in Pharmacological Sciences*, **25**, 105-111.
- Gurevich, V.V., Gurevich, E.V.** (2014). Extensive shape shifting underlies functional versatility of arrestins. *Current Opinion in Cell Biology*, **27**, 1-9.
- Gurevich, V.V., Hanson, S.M., Song, X., Vishnivetskiy, S.A., Gurevich, E.V.** (2011). The functional cycle of visual arrestins in photoreceptor cells. *Progress in Retinal and Eye Research*, **30**, 405-430.
- Hanson, S.M., Francis, D.J., Vishnivetskiy, S.A., Klug, C.S., Gurevich, V.V.** (2006). Visual arrestin binding to microtubules involves a distinct conformational change. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 9765-9772.
- Hargrave, P.A.** (1977). The amino-terminal tryptic peptide of bovine rhodopsin. A glycopeptide containing two sites of oligosaccharide attachment. *Biochimica et biophysica acta*, **492**, 83-94.
- Hargrave, P.A., Fong, S.L., Hugh McDowell, J., Mas, M.T., Curtis, D.R., Wang, J.K., Juszczak, E., Smith, D.P.** (1980). The partial primary structure of bovine rhodopsin and its topography in the retinal rod cell disc membrane. *Neurochemistry international*, **1**, 231-244.
- He, W., Cowan, C.W., Wensel, T.G.** (1998). RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction. *Neuron*, **20**, 95-102.
- Heck, M., Hofmann, K.P.** (2004). Protein function V: Membrane receptors. *Physics meets Biology*, (Gompper, G., Kaupp, U.B., Dhont, J.K.G., Richter, D., Winkler, R.G. Editors) Forschungszentrum Jülich GmbH, Jülich, D8.1- D8.17.
- Heck, M., Schädel, S.A., Maretzki, D., Hofmann, K.P.** (2003). Secondary binding sites of retinoids in opsin: characterization and role in regeneration. *Vision research*, **43**, 3003-3010.
- Herrmann, R., Heck, M., Henklein, P., Hofmann, K.P., Ernst, O.P.** (2006). Signal transfer from GPCRs to G proteins: role of the G alpha N-terminal region in rhodopsin-transducin coupling. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 30234-30241.
- Hilger, D., Masureel, M., Kobilka, B.K.** (2018). Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nature structural & molecular biology*, **25**, 4-12.
- Hirsch, J.A., Schubert, C., Gurevich, V.V., Sigler, P.B.** (1999). The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell*, **97**, 257-269.
- Hofmann, K.P., Pulvermüller, A., Buczylo, J., Van Hooser, P., Palczewski, K.** (1992). The role of arrestin and retinoids in the regeneration pathway of rhodopsin. *The Journal of biological chemistry*, **267**, 15701-15706.
- Hofmann, K.P., Scheerer, P., Hildebrand, P.W., Choe, H.W., Park, J.H., Heck, M., Ernst, O.P.** (2009). A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model. *Trends in Biochemical Sciences*, **34**, 540-552.
- Hu, G.M., Mai, T.L., Chen, C.M.** (2017). Visualizing the GPCR Network: Classification and Evolution. *Scientific reports*, **7**, 15495: 1-15.
- Hu, G., Wensel, T.G.** (2002). R9AP, a membrane anchor for the photoreceptor GTPase accelerating protein, RGS9-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 9755-9760.
- Huang, W., Masureel, M., Qianhui, Q., Janetzko, J., Inoue, A., Kato, H.E., Robertson, M.J., Nguyen, K.C., Glenn, J.S., Skiniotis, G., Kobilka, B.K.** (2020). Structure of the neurotensin receptor 1 in complex with beta-arrestin 1. *Nature*, doi: 10.1038/s41586-020-1953-1.

- Hubbard, R., Brown, P.K., Bownds, D. (1971). Methodology of vitamin A and visual pigments. *Methods in Enzymology*, **18**, 615-653.
- Hurley, J.B., Spencer, M., Niemi, G.A. (1998). Rhodopsin phosphorylation and its role in photoreceptor function. *Vision research*, **38**, 1341-1352.
- Hurley, J.B., Stryer, L. (1982). Purification and characterization of the gamma regulatory subunit of the cyclic GMP phosphodiesterase from retinal rod outer segments. *The Journal of biological chemistry*, **257**, 11094-11099.
- Inagaki, S., Ghirlando, R., Vishnivetskiy, S.A., Homan, K.T., White, J.F., Tesmer, J.J., Gurevich, V. V., Grisshammer, R. (2015) G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 (GRK2) and 5 (GRK5) Exhibit Selective Phosphorylation of the Neurotensin Receptor in Vitro. *Biochemistry*, **54**, 4320-4329.
- Inglese, J., Koch, W.J., Caron, M.G., Lefkowitz, R.J. (1992). Isoprenylation in regulation of signal transduction by G-protein-coupled receptor kinases. *Nature*, **359**, 147-150.
- Ingram, N.T., Sampath, A.P., Fain, G.L. (2016). Why are rods more sensitive than cones? *The Journal of physiology*, **594**, 5415-5426.
- Jäger, S., Palczewski, K., Hofmann, K.P. (1996). Opsin/all-trans-retinal complex activates transducin by different mechanisms than photolyzed rhodopsin. *Biochemistry*, **35**, 2901-2908.
- Kang, D.S., Tian, H., Benovic, J.L. (2014). Role of  $\beta$ -arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking. *Current Opinion in Cell Biology*, **27**, 63-71.
- Kang, Y., Zhou, X.E., Gao, X., He, Y., Liu, W., Ishchenko, A., Barty, A., White, T.A., Yefanov, O., Han, G.W., Xu, Q., de Waal, P.W., Ke, J., Tan, M.H., Zhang, C., Moeller, A., West, G.M., Pascal, B.D., Van Eps, N., Caro, L.N., Vishnivetskiy, S.A., Lee, R.J., Suino-Powell, K.M., Gu, X., Pal, K., Ma, J., Zhi, X., Boutet, S., Williams, G.J., Messerschmidt, M., Gati, C., Zatsepin, N.A., Wang, D., James, D., Basu, S., Roy-Chowdhury, S., Conrad, C.E., Coe, J., Liu, H., Lisova, S., Kupitz, C., Grotjohann, I., Fromme, R., Jiang, Y., Tan, M., Yang, H., Li, J., Wang, M., Zheng, Z., Li, D., Howe, N., Zhao, Y., Standfuss, J., Diederichs, K., Dong, Y., Potter, C.S., Carragher, B., Caffrey, M., Jiang, H., Chapman, H.N., Spence, J.C., Fromme, P., Weierstall, U., Ernst, O.P., Katritch, V., Gurevich, V.V., Griffin, P.R., Hubbell, W.L., Stevens, R.C., Cherezov, V., Melcher, K., Xu, H.E. (2015). Crystal structure of rhodopsin bound to arrestin by femtosecond X-ray laser. *Nature*, **523**, 561-567.
- Karnik, S.S., Sakmar, T.P., Chen, H.B., Khorana, H.G. (1988). Cysteine residues 110 and 187 are essential for the formation of correct structure in bovine rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **85**, 8459-8463.
- Kaupp, U.B., Seifert, R. (2002). Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiological reviews*, **82**, 769-824.
- Kennedy, M.J., Lee, K.A., Niemi, G.A., Craven, K.B., Garwin, G.G., Saari, J.C., Hurley, J.B. (2001). Multiple phosphorylation of rhodopsin and the in vivo chemistry underlying rod photoreceptor dark adaptation. *Neuron*, **31**, 87-101.
- Kim, J., Ahn, S., Ren, X.R., Whalen, E.J., Reiter, E., Wei, H., Lefkowitz, R.J. (2005). Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for  $\beta$ -arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 1442-1447.
- Kim, Y.J., Hofmann, K.P., Ernst, O.P., Scheerer, P., Choe, Sommer, M.E. (2013). Crystal structure of pre-activated arrestin p44. *Nature*, **497**, 142-146.
- Kirchberg, K., Kim, T.Y., Moller, M., Skegrod, D., Dasara Raju, G., Granzin, J., Buldt, G., Schlesinger, R., Alexiev, U. (2011). Conformational dynamics of helix 8 in the GPCR rhodopsin controls arrestin activation in the desensitization process. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 18690-18695.
- Kiser, P.D., Golczak, M., Maeda, A., Palczewski, K. (2012). Key enzymes of the retinoid (visual) cycle in vertebrate retina. *Biochimica et biophysica acta*, **1821**, 137-151.

- Kniazeff, J., Prezeau, L., Rondard, P., Pin, J.P., Goudet, C.** (2011). Dimers and beyond: The functional puzzles of class C GPCRs. *Pharmacology & therapeutics*, **130**, 9-25.
- Kokame, K., Fukada, Y., Yoshizawa, T., Takao, T., Shimonishi, Y.** (1992). Lipid modification at the N terminus of photoreceptor G-protein alpha-subunit. *Nature*, **359**, 749-752.
- Kolesnikov, A.V., Orban, T., Jin, H., Brooks, C., Hofmann, L., Dong, Z., Sokolov, M., Palczewski, K., Kefalov, V.J.** (2017). Dephosphorylation by protein phosphatase 2A regulates visual pigment regeneration and the dark adaptation of mammalian photoreceptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **114**, E9675-E9684.
- Krispel, C.M., Chen, D., Melling, N., Chen, Y.J., Martemyanov, K.A., Quillinan, N., Arshavsky, V.Y., Wensel, T.G., Chen, C.K., Burns, M.E.** (2006). RGS expression rate-limits recovery of rod photoresponses. *Neuron*, **51**, 409-416.
- Kühn, H.** (1982). Light-regulated binding of proteins to photoreceptor membranes and its use for the purification of several rod cell proteins. *Methods in Enzymology*, **81**, 556-564.
- Kühn, H., McDowell, H.J.** (1977). Isoelectric focusing of phosphorylated cattle rhodopsin. *Biophysics of structure and mechanism*, **3**, 199-203.
- Kühn, H., Wilden, U.** (1987). Deactivation of photoactivated rhodopsin by rhodopsin-kinase and arrestin. *Journal of receptor research*, **7**, 283-298.
- Kühne, W.** (1877). Zur Photochemie der Netzhaut - *Untersuchungen aus dem Physiologischen Institut der Universität Heidelberg*, **1**, 1-138.
- Kühne, W.** (1878). On the photochemistry of the retina and on visual purple (Foster, M., Translated to English) *London, MacMillan and Co.*, 1-104.
- Kumari, P., Srivastava, A., Banerjee, R., Ghosh, E., Gupta, P., Ranjan, R., Chen, X., Gupta, B., Gupta, C., Jaiman, D., Shukla, A.K.** (2016). Functional competence of a partially engaged GPCR-beta-arrestin complex. *Nature Communications*, **7**: 13416.
- Lally, C.C., Sommer, M.E.** (2015). Quantification of arrestin-rhodopsin binding stoichiometry. *Methods in Molecular Biology*, **1271**, 235-250.
- Lally, C.C., Bauer, B., Selent, S., Sommer, M.E.** (2017). C-edge loops of arrestin function as a membrane anchor. *Nature communications*, **8**, 1-12.
- Lamb, T.D., Heck, M., Kraft, T.W.** (2018). Implications of dimeric activation of PDE6 for rod photo-transduction. *Open biology*, **8**: 180076.
- Lamb, T.D., Pugh Jr., E.N.** (2006). Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **47**, 5137-5152.
- Langlois, G., Chen, C.K., Palczewski, K., Hurley, J.B., Vuong, T.M.** (1996). Responses of the photo transduction cascade to dim light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 4677-4682.
- Latorraca, N.R., Wang, J.K., Bauer, B., Townshend, R.J.L., Hollingsworth, S.A., Olivieri, J.E., Xu, H.E., Sommer, M.E., Dror, R.O.** (2018). Molecular mechanism of GPCR-mediated arrestin activation. *Nature*, **557**, 452-456.
- Lee, K.A., Nawrot, M., Garwin, G.G., Saari, J.C., Hurley, J.B.** (2010). Relationships among visual cycle retinoids, rhodopsin phosphorylation, and phototransduction in mouse eyes during light and dark adaptation. *Biochemistry*, **49**, 2454-2463.
- Lefkowitz, R.J., Shenoy, S.K.** (2005). Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, **308**, 512-517.
- Liang, Y., Fotiadis, D., Filipek, S., Saperstein, D.A., Palczewski, K., Engel, A.** (2003). Organization of the G protein-coupled receptors rhodopsin and opsin in native membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **278**, 21655-21662.
- Liebman, P.A., Entine, G.** (1974). Lateral diffusion of visual pigment in photoreceptor disk membranes. *Science*, **185**, 457-459.
- Liggett, S.B.** (2011). Phosphorylation barcoding as a mechanism of directing GPCR signaling. *Science Signaling*, **4**, pe36.



- Liu, X., Seno, K., Nishizawa, Y., Hayashi, F., Yamazaki, A., Matsumoto, H., Wakabayashi, T., Usukura, J. (1994). Ultrastructural localization of retinal guanylate cyclase in human and monkey retinas. *Experimental eye research*, **59**, 761-768.
- Lohse, M.J., Hoffmann, C. (2014). Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. *Handbook of Experimental Pharmacology*, **219**, 15-56.
- Lowe, D.G., Dizhoor, A.M., Liu, K., Gu, Q., Spencer, M., Laura, R., Lu, L., Hurley, J.B. (1995). Cloning and expression of a second photoreceptor-specific membrane retina guanylyl cyclase (RetGC), RetGC-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 5535-5539.
- Maeda, T., Imanishi, Y., Palczewski, K. (2003). Rhodopsin phosphorylation: 30 years later. *Progress in retinal and eye research*, **22**, 417-434.
- Maeda, A., Maeda, T., Golczak, M., Chou, S., Desai, A., Hoppel, C.L., Matsuyama, S., Palczewski, K. (2009). Involvement of all-trans-retinal in acute light-induced retinopathy of mice. *The Journal of biological chemistry*, **284**, 15173-15183.
- Mahalingam, M., Martinez-Mayorga, K., Brown, M.F., Vogel, R. (2008). Two protonation switches control rhodopsin activation in membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 17795-17800.
- Makino, C.L., Wen, X.H., Lem, J. (2003). Piecing together the timetable for visual transduction with transgenic animals. *Current opinion in neurobiology*, **13**, 404-412.
- Makino, E.R., Handy, J.W., Li, T., Arshavsky, V.Y. (1999) The GTPase activating factor for transducin in rod photoreceptors is the complex between RGS9 and type 5 G protein beta subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 1947-1952.
- Mansoor, S.E., McHaourab, H.S., Farrens, D.L. (1999). Determination of protein secondary structure and solvent accessibility using site-directed fluorescence labeling. Studies of T4 lysozyme using the fluorescent probe monobromobimane. *Biochemistry*, **38**, 16383-16393.
- Marmor, M.F., Martin, L.J. (1978). 100 Years of the Visual Cycle. *Survey of ophthalmology*, **22**, 279-285.
- Matthews, R.G., Hubbard, R., Brown, P.K., Wald, G. (1963). Tautomeric Forms of Meta-rhodopsin. *The Journal of General Physiology*, **47**, 215-240.
- Mayer, D., Damberger, F.F., Samarasingh, M., Feldmueller, M., Vuckovic, Z., Flock, T., Bauer, B., Mutt, E., Zosel, F., Allain, F.H.T., Standfuss, J., Schertler, G.F.X., Deupi, X., Sommer, M.E., Hurevich, M., Friedler, A., Veprintsev, D.B. (2019). Distinct G protein-coupled receptor phosphorylation motifs modulate arrestin affinity and activation and global conformation. *Nature Communications*, **10**: 1261.
- Mayhew, T.M., Astle, D. (1997). Photoreceptor number and outer segment disk membrane surface area in the retina of the rat: stereological data for whole organ and average photoreceptor cell. *Journal of neurocytology*, **26**, 53-61.
- McDowell, H.J., Nawrocki, J.P., Hargrave, P.A. (1993). Phosphorylation sites in bovine rhodopsin. *Biochemistry*, **32**, 4968-4974.
- McDowell, H.J., Nawrocki, J.P., Hargrave, P.A. (2000). Isolation of isoelectric species of phosphorylated rhodopsin. *Methods in Enzymology*, **315**, 70-76.
- Mendez, A., Burns, M.E., Roca, A., Lem, J., Wu, L.W., Simon, M.I., Baylor, D.A., Chen, J. (2000). Rapid and reproducible deactivation of rhodopsin requires multiple phosphorylation sites. *Neuron*, **28**, 153-164.
- Miljanich, G.P., Nemes, P.P., White, D.L., Dratz, E.A. (1981). The asymmetric transmembrane distribution of phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine, and fatty acids of the bovine retinal rod outer segment disk membrane. *The Journal of membrane biology*, **60**, 249-255.
- Modzelewska, A., Filippek, S., Palczewski, K., Park, P.S. (2006). Arrestin interaction with rhodopsin: conceptual models. *Cell Biochemistry and Biophysics*, **46**, 1-15.

- Molday, R.S., Moritz, O.L. (2015). Photoreceptors at a glance. *Journal of cell science*, **128**, 4039-4045.
- Müller, F., Kaupp, U.B. (1998). Signaltransduktion in Sehzellen. *Naturwissenschaften*, **85**, 49-61.
- Neubert, T.A., Johnson, R.S., Hurley, J.B., Walsh, K.A. (1992). The rod transducin alpha subunit amino terminus is heterogeneously fatty acylated. *The Journal of biological chemistry*, **267**, 18274-18277.
- Nickell, S., Park, P.S., Baumeister, W., Palczewski, K. (2007). Three-dimensional architecture of murine rod outer segments determined by cryoelectron tomography. *The Journal of cell biology*, **177**, 917-925.
- Nobles, K.N., Xiao, K., Ahn, S., Shukla, A.K., Lam, C.M., Rajagopal, S., Strachan, R.T., Huang, T.Y., Bressler, E.A., Hara, M.R., Shenoy, S.K., Gygi, S.P., Lefkowitz, R. J. (2011). Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Science signaling*, **4**, ra51.
- Ohguro, H., Johnson, R.S., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Palczewski, K. (1994). Control of rhodopsin multiple phosphorylation. *Biochemistry*, **33**, 1023-1028.
- Ohguro, H., Rudnicka-Nawrot, M., Buczylo, J., Zhao, X., Taylor, J.A., Walsh, K.A., Palczewski, K. (1996). Structural and enzymatic aspects of rhodopsin phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*, **271**, 5215-5224.
- Ohguro, H., Palczewski, K., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Johnson, R.S. (1993). Sequential phosphorylation of rhodopsin at multiple sites. *Biochemistry*, **32**, 5718-5724.
- Ohguro, H., Van Hooser, J.P., Milam, A.H., Palczewski, K. (1995). Rhodopsin phosphorylation and dephosphorylation in vivo. *The Journal of biological chemistry*, **270**, 14259-14262.
- Okada, T., Ernst, O.P., Palczewski, K., Hofmann, K.P. (2001). Activation of rhodopsin: new insights from structural and biochemical studies. *Trends in biochemical sciences*, **26**, 318-324.
- Oldham, W.M., Hamm, H.E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **9**, 60-71.
- Ovchinnikov Y.A., Abdulaev, N.G., Bogachuk, A.S. (1988). Two adjacent cysteine residues in the C-terminal cytoplasmic fragment of bovine rhodopsin are palmitylated. *FEBS letters*, **230**, 1-5.
- Palczewski, K. (2012). Chemistry and biology of vision. *The Journal of biological chemistry*, **287**, 1612-1619.
- Palczewski, K., Buczylo, J., Kaplan, M.W., Polans, A.S., Crabb, J.W. (1991). Mechanism of rhodopsin kinase activation. *The Journal of biological chemistry*, **266**, 12949-12955.
- Palczewski, K., Buczylo, J., Lebioda, L., Crabb, J.W., Polans, A.S. (1993). Identification of the N-terminal region in rhodopsin kinase involved in its interaction with rhodopsin. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 6004-6013.
- Palczewski, K., Buczylo, J., Ohguro, H., Annan, R.S., Carr, S.A., Crabb, J.W., Kaplan, M.W., Johnson, R.S., Walsh, K.A. (1994). Characterization of a truncated form of arrestin isolated from bovine rod outer segments. *Protein Science*, **3**, 314-324.
- Palczewski, K., Buczylo, J., Van Hooser, P., Carr, S.A., Huddleston, M.J., Crabb, J.W. (1992). Identification of the autophosphorylation sites in rhodopsin kinase. *The Journal of biological chemistry*, **267**, 18991-18998.
- Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E., Yamamoto, M., Miyano, M. (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, **289**, 739-745.
- Palczewski, K., Hargrave, P.A., McDowell, J.H., Ingebritsen, T.S. (1989, A). The catalytic subunit of phosphatase 2A dephosphorylates phosphoropsin. *Biochemistry*, **28**, 415-419.
- Palczewski, K., McDowell, J.H., Hargrave, P.A. (1988). Rhodopsin kinase: substrate specificity and factors that influence activity. *Biochemistry*, **27**, 2306-2313.
- Palczewski, K., McDowell, J.H., Jakes, S., Ingebritsen, T.S., Hargrave, P.A. (1989, B). Regulation of rhodopsin dephosphorylation by arrestin. *The Journal of biological chemistry*, **264**, 15770-15773.

- Palczewski, K., Pulvermüller, A., Buczylo, J., Hofmann, K.P.** (1991). Phosphorylated rhodopsin and heparin induce similar conformational changes in arrestin. *Journal of Biological Chemistry*, **266**, 18649-18654.
- Papac, D.I., Oatis, J.E. Jr., Crouch, R.K., Knapp, D. R.** (1993). Mass spectrometric identification of phosphorylation sites in bleached bovine rhodopsin. *Biochemistry*, **32**, 5930-5934.
- Park, J.H., Filipek, S., Wells, J.W., Palczewski, K.** (2004). Oligomerization of G protein-coupled receptors: past, present, and future. *Biochemistry*, **43**, 15643-15656.
- Park, J.H., Scheerer, P., Hofmann, K.P., Choe, H.W., Ernst, O.P.** (2008). Crystal structure of the ligand free G-protein-coupled receptor opsin. *Nature*, **454**, 183-187.
- Pfister, C., Chabre, M., Plouet, J., Tuyen, V.V., De Kozak, Y., Faure, J.P., Kühn, H.** (1985). Retinal S antigen identified as the 48K protein regulating light-dependent phosphodiesterase in rods. *Science*, **228**, 891-893.
- Plantner, J.J., Kean, E.L.** (1976). Carbohydrate composition of bovine rhodopsin. *The Journal of biological chemistry*, **251**, 1548-1552.
- Papermaster, D.S., Dreyer, W.J.** (1974). Rhodopsin content in the outer segment membranes of bovine and frog retinal rods. *Biochemistry*, **13**, 2438-2444.
- Papermaster, D.S.** (1982). Preparation of retinal rod outer segments. *Methods in Enzymology*, **81**, 48-52.
- Parkes, J.H., Liebman, P.A.** (1984). Temperature and pH dependence of the metarhodopsin I-metarhodopsin II kinetics and equilibria in bovine rod disk membrane suspensions. *Biochemistry*, **23**, 5054-5061.
- Peterhans, C., Lally, C.C., Ostermaier, M.K., Sommer, M.E., Standfuss, J.** (2016). Functional map of arrestin binding to phosphorylated opsin, with and without agonist. *Scientific Reports*, **6**: 28686.
- Prihandoko, R., Bradley, S.J., Tobin, A.B., Butcher, A.J.** (2015). Determination of GPCR Phosphorylation Status: Establishing a Phosphorylation Barcode. *Current Protocols in Pharmacology*, **69**, 2.13.1-2.13.26.
- Pulvermüller, A., Maretzki, D., Rudnicka-Nawrot, M., Smith, W.C., Palczewski, K., Hofmann, K.P.** (1997). Functional differences in the interaction of arrestin and its splice variant, p44, with rhodopsin. *Biochemistry*, **36**, 9253-9260.
- Pulvermüller, A., Palczewski, K., Hofmann, K.P.** (1993). Interaction between photoactivated rhodopsin and its kinase: stability and kinetics of complex formation. *Biochemistry*, **32**, 14082-14088.
- Qin, N., Pittler, S.J., Baehr, W.** (1992). In vitro isoprenylation and membrane association of mouse rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase alpha and beta subunits expressed in bacteria. *The Journal of biological chemistry*, **267**, 8458-8463.
- Rader, A.J., Anderson, G., Isin, B., Khorana, H.G., Bahar, I., Klein-Seetharaman, J.** (2004). Identification of core amino acids stabilizing rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**, 7246-7251.
- Righetti, P.G.** (1983). Isoelectric Focusing: Theory, Methodology and Applications. *Elsevier Biomedical Press*, Amsterdam, **11**, 141-147.
- Rodieck, R.W.** (1998). The First Steps in Seeing. *Sinauer Associate*, Sunderland, MA.
- Rożanowska, M., Sarna, T.** (2005). Light-induced damage to the retina: role of rhodopsin chromophore revisited. *Photochemistry and Photobiology*, **81**, 1305-1330.
- Scheerer, P., Park, J.H., Hildebrand, P.W., Kim, Y.J., Krauss, N., Choe, H.W., Hofmann, K.P., Ernst, O.P.** (2008). Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation. *Nature*, **455**, 497-502.
- Scheerer, P., Sommer, M.E.** (2017). Structural mechanism of arrestin activation. *Current opinion in structural biology*, **45**, 160-169.
- Schioth, H.B., Fredriksson, R.** (2005). The GRAFS classification system of G-protein coupled receptors in comparative perspective. *General and comparative endocrinology*, **142**, 94-101.
- Schleicher, A., Kühn, H., Hofmann, K.P.** (1989). Kinetics, binding constant, and activation energy of the 48-kDa protein-rhodopsin complex by extra-metarhodopsin II. *Biochemistry*, **28**, 1770-1775.

- Schöneberg, J., Heck, M., Hofmann, K.P., Noe, F. (2014). Explicit spatiotemporal simulation of receptor-G protein coupling in rod cell disk membranes. *Biophysical journal*, **107**, 1042-1053.
- Schröder, K., Pulvermüller, A., Hofmann, K.P. (2002). Arrestin and its splice variant Arr1-370A (p44). Mechanism and biological role of their interaction with rhodopsin. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 43987-43996.
- Schubert, C., Hirsch, J.A., Gurevich, V.V., Engelman, D.M., Sigler, P.B., Fleming, K.G. (1999). Visual arrestin activity may be regulated by self-association. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 21186-21190.
- Schultze, M. (1866). Zur Anatomie und Physiologie der Retina. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, **2**, 175-286.
- Schultze, M. (1867). Über Stäbchen und Zapfen der Retina. *Archiv für mikroskopische Anatomie*, **3**, 215-247.
- Sente, A., Peer, R., Srivastava, A., Baidya, M., Lesk, A.M., Balaji, S., Shukla, A.K., Babu, M.M., Flock, T. (2018). Molecular mechanism of modulating arrestin conformation by GPCR phosphorylation. *Nature structural & molecular biology*, **25**, 538-545.
- Shan, L., Anderson, D.J. (2002). Gradient chromatofocusing. versatile pH gradient separation of proteins in ion-exchange HPLC: characterization studies. *Analytical Chemistry*, **74**, 5641-5649.
- Shen, H., Li, X., Bieberich, C.J., Frey, D.D. (2008). Reducing sample complexity in proteomics by chromatofocusing with simple buffer mixtures. *Methods in Molecular Biology*, **424**, 187-203.
- Shinohara, T., Dietzschold, B., Craft, C.M., Wistow, G., Early, J.J., Donoso, L.A., Horwitz, J., Tao, R. (1987). Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **84**, 6975-6979.
- Shukla, A.K., Manglik, A., Kruse, A.C., Xiao, K., Reis, R.I., Tseng, W.C., Staus, D.P., Hilger, D., Uysal, S., Huang, L.Y., Paduch, M., Tripathi-Shukla, P., Koide, A., Koide, S., Weis, W.I., Kossiakoff, A.A., Kobilka, B.K., Lefkowitz, R.J. (2013). Structure of active beta-arrestin-1 bound to a G-protein-coupled receptor phosphopeptide. *Nature*, **497**, 137-141.
- Shukla, A.K., Violin, J.D., Whalen, E.J., Gesty-Palmer, D., Shenoy, S.K., Lefkowitz, R.J. (2008). Distinct conformational changes in beta-arrestin report biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 9988-93.
- Shukla, A.K., Westfield, G.H., Xiao, K., Reis, R.I., Huang, L.Y., Tripathi-Shukla, P., Qian, J., Li, S., Blanc, A., Oleskie, A.N., Dosey, A.M., Su, M., Liang, C.R., Gu, L.L., Shan, J.M., Chen, X., Hanna, R., Choi, M., Yao, X.J., Klink, B.U., Kahsai, A.W., Sidhu, S.S., Koide, S., Penczek, P.A., Kossiakoff, A.A., Woods, V.L.Jr., Kobilka, B.K., Skiniotis, G., Lefkowitz, R.J. (2014). Visualization of arrestin recruitment by a G-protein-coupled receptor. *Nature*, **512**, 218-222.
- Shukla, A.K., Xiao, K., Lefkowitz, R.J. (2011). Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends in biochemical sciences*, **36**, 457-469.
- Slyterman, L.A.AE, Wijdenes, J. (1977). Chromatofocusing: Isoelectric focusing on Ion exchangers in the absence of an externally applied potential. *Electrofocusing and Isotachopheresis: Proceedings of the International Symposium*, 463-466.
- Slyterman, L.A.AE, Elgersma, O. (1978). Chromatofocusing: Isoelectric focusing on Ion exchange columns. I. General principles. *Journal of Chromatography*, **150**, 17-30.
- Slyterman, L.A.AE, Wijdenes, J. (1978). Chromatofocusing: Isoelectric focusing on Ion exchange columns. II. Experimental verification. *Journal of Chromatography*, **150**, 31-44.
- Slyterman, L.A.AE, Wijdenes, J. (1981). Chromatofocusing. III. The properties of a DEAE-agarose anion exchanger and its suitability for protein separations. *Journal of Chromatography*, **206**, 429-440.
- Slyterman, L.A.AE, Wijdenes, J. (1981). Chromatofocusing. IV. Properties of an agarose polyethyleneimine ion exchanger and its suitability for protein separations. *Journal of Chromatography*, **206**, 441-447.

- Smith, W.C., Milam, A.H., Dugger, D., Arendt, A., Hargrave, P.A., Palczewski, K. (1994). A splice variant of arrestin. Molecular cloning and localization in bovine retina. *The Journal of biological chemistry*, **269**, 15407-15410.
- Sokal, I., Pulvermüller, A., Buczylo, J., Hofmann, K.P., Palczewski, K. (2002). Rhodopsin and its kinase. *Methods in enzymology*, **343**, 578-600.
- Sommer, M.E., Elgeti, M., Hildebrand, P.W., Szczepek, M., Hofmann, K.P., Scheerer, P. (2015). Structure-based biophysical analysis of the interaction of rhodopsin with g protein and arrestin. *Methods in enzymology*, **556**, 563-608.
- Sommer, M.E., Farrens, D.L. (2006). Arrestin can act as a regulator of rhodopsin photochemistry. *Vision research*, **46**, 4532-4546.
- Sommer, M.E., Farrens, D.L., McDowell, J.H., Weber, L.A., Smith, W.C. (2007). Dynamics of arrestin-rhodopsin interactions: loop movement is involved in arrestin activation and receptor binding. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 25560-25568.
- Sommer, M.E., Hofmann, K.P., Heck, M. (2011). Arrestin-rhodopsin binding stoichiometry in isolated rod outer segment membranes depends on the percentage of activated receptors. *The Journal of biological chemistry*, **286**, 7359-7369.
- Sommer, M.E., Hofmann, K.P., Heck, M. (2012). Distinct loops in arrestin differentially regulate ligand binding within the GPCR opsin. *Nature communication*, **3**, 1-7.
- Sommer, M.E., Hofmann, K.P., Heck, M. (2014). Not just signal shutoff: the protective role of arrestin-1 in rod cells. *Handbook of experimental pharmacology*, **219**, 101-116.
- Sommer, M.E., Smith, W.C., Farrens, D.L. (2005). Dynamics of arrestin-rhodopsin interactions: arrestin and retinal release are directly linked events; *The Journal of biological chemistry*, **280**, 6861-6871.
- Sommer, M.E., Smith, W.C., Farrens, D.L. (2006). Dynamics of arrestin-rhodopsin interactions: acidic phospholipids enable binding of arrestin to purified rhodopsin in detergent. *The Journal of biological chemistry*, **281**, 9407-9417.
- Sparrow, J.R., Wu, Y., Kim, C.Y., Zhou, J. (2010). Phospholipid meets all-trans-retinal: the making of RPE bisretinoids. *Journal of Lipid Research*, **51**, 247-261.
- Sriram, K., Insel, P.A. (2018). G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Molecular pharmacology*, **93**, 251-258.
- Staus, D.P., Hu, H., Robertson, M.J., Kleinhenz, A.L.W., Winkler, L.M., Capel, W.D., Latorraca, N.R., Lefkowitz, R., Skinotis, G. (2020). Structure of the M2 muscarinic receptor- $\beta$ -arrestin complex in a lipid nanodisc. *Nature*, doi: 10.1038/s41586-020-1954-0.
- Steinemann, A., Stryer, L. (1973). Accessibility of the carbohydrate moiety of rhodopsin. *Biochemistry*, **12**, 1499-1502.
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*, **85**, 845-881.
- Stubbs, G.W., Litman, B.J. (1978). Effect of alterations in the amphipathic microenvironment on the conformational stability of bovine opsin. 1. Mechanism of solubilization of disk membranes by the nonionic detergent, octyl glucoside. *Biochemistry*, **17**, 215-219.
- Szczepek, M., Beyrière, F., Hofmann, K.P., Elgeti, M., Kazmin, R., Rose, A., Bartl, F.J., von Stetten, D., Heck, M., Sommer, M.E., Hildebrand, P.W., Scheerer, P. (2014). Crystal structure of a common GPCR-binding interface for G protein and arrestin. *Nature communications*, **5**, 1-8.
- Thompson, P., Findlay, J.B. (1984). Phosphorylation of ovine rhodopsin. Identification of the phosphorylated sites. *The Biochemical journal*, **220**, 773-780.
- Tsukamoto, H., Sinha, A., DeWitt, M., Farrens, D.L. (2010). Monomeric rhodopsin is the minimal functional unit required for arrestin binding. *Journal of Molecular Biology*, **399**, 501-11.
- Vishnivetskiy, S.A., Paz, C.L., Schubert, C., Hirsch, J.A., Sigler, P.B., Gurevich, V.V. (1999). How does arrestin respond to the phosphorylated state of rhodopsin? *The Journal of biological chemistry*, **274**, 11451-11454.
- Vishnivetskiy, S.A., Raman, D., Wei, J., Kennedy, M.J., Hurley, J. B., Gurevich, V.V. (2007). Regulation of arrestin binding by rhodopsin phosphorylation level. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 32075-32083.

- Vishnivetskiy, S.A., Schubert, C., Climaco, G.C., Gurevich, Y.V., Velez, M.G., Gurevich, V.V. (2000). An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 41049-41057.
- Wald, G. (1968). Molecular basis of visual excitation. *Science*, **162**, 230-239.
- Wald, G., Brown, P.K. (1953). The molar extinction of rhodopsin. *The Journal of general physiology*, **37**, 189-200.
- Wang, N., Anderson, R.E. (1992). Enrichment of polyunsaturated fatty acids from rat retinal pigment epithelium to rod outer segments. *Current eye research*, **11**, 783-791.
- Wang, Q., Schoenlein, R.W., Peteanu, L.A., Mathies, R.A., Shank, C.V. (1994). Vibrationally coherent photochemistry in the femtosecond primary event of vision. *Science*, **266**, 422-424.
- Whited, A.M., Park, P.S. (2015). Nanodomain organization of rhodopsin in native human and murine rod outer segment disc membranes. *Biochimica et biophysica acta*, **1848**, 26-34.
- Whorton, M.R., Bokoch, M.P., Rasmussen, S.G., Huang, B., Zare, R.N., Kobilka, B., Sunahara, R.K. (2007). A monomeric G protein-coupled receptor isolated in a high-density lipoprotein particle efficiently activates its G protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 7682-7687.
- Whorton, M.R., Jastrzebska, B., Park, P.S., Fotiadis, D., Engel, A., Palczewski, K., Sunahara, R.K. (2008). Efficient coupling of transducin to monomeric rhodopsin in a phospholipid bilayer. *The Journal of biological chemistry*, **283**, 4387-4394.
- Wilden, U., Hall, S.W., Kühn, H. (1986). Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **83**, 1174-1178.
- Wilden, U., Kühn, H. (1982). Light-dependent phosphorylation of rhodopsin: number of phosphorylation sites. *Biochemistry*, **21**, 3014-3022.
- Xiao, K., McClatchy, D.B., Shukla, A.K., Zhao, Y., Chen, M., Shenoy, S.K., Yates, J.R. 3<sup>rd</sup>, Lefkowitz, R.J. (2007). Functional specialization of beta-arrestin interactions revealed by proteomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **104**, 12011-12016.
- Xiao, K., Shenoy, S.K., Nobles, K., Lefkowitz, R.J. (2004). Activation-dependent conformational changes in {beta}-arrestin 2. *Journal of Biological Chemistry*, **279**, 55744-55753.
- Yang, F., Xiao, P., Qu, C.X., Liu, Q., Wang, L.Y., Liu, Z.X., He, Q.T., Liu, C., Xu, J.Y., Li, R.R., Li, M.J., Li, Q., Guo, X.Z., Yang, Z.Y., He, D.F., Yi, F., Ruan, K., Shen, Y.M., Yu, X., Sun, J.P., Wang, J. (2018). Allosteric mechanisms underlie GPCR signaling to SH3-domain proteins through arrestin. *Nature Chemical Biology*, **14**: 876-886.
- Yang, F., Yu, X., Liu, C., Qu, C.X., Gong, Z., Liu, H.D., Li, F.H., Wang, H.M., He, D.F., Yi, F., Song, C., Tian, C.L., Xiao, K.H., Wang, J.Y., Sun, J.P. (2015). Phospho-selective mechanisms of arrestin conformations and functions revealed by unnatural amino acid incorporation and (19)F-NMR. *Nature Communications*, **16**: 8202.
- Yin, W., Li, Z., Jin, M., Yin, Y.L., de Waal, P.W., Pal, K., Yin, Y., Gao, X., He, Y., Gao, J., Wang, X., Zhang, Y., Zhou, H., Melcher, K., Jiang, Y., Cong, Y., Edward Zhou, X., Yu, X., Eric Xu, H. (2019). A complex structure of arrestin-2 bound to a G protein-coupled receptor. *Cell Research*, **29**, 971-983.
- Young, R.W. (1976). Visual cells and the concept of renewal. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **15**, 700-725.
- Zhou, X.E., He, Y., de Waal, P.W., Gao, X., Kang, Y., Van Eps, N., Yin, Y., Pal, K., Goswami, D., White, T.A., Barty, A., Latorraca, N.R., Chapman, H.N., Hubbell, W.L., Dror, R.O., Stevens, R.C., Cherezov, V., Gurevich, V.V., Griffin, P.R., Ernst, O.P., Melcher, K., Xu, H.E. (2017). Identification of Phosphorylation Codes for Arrestin Recruitment by G Protein-Coupled Receptors. *Cell*, **170**, 457-469.

- Zhuang, T., Chen, Q., Cho, M.K., Vishnivetskiy, S.A., Iverson, T.M., Gurevich, V.V., Sanders, C.R.** (2013). Involvement of distinct arrestin-1 elements in binding to different functional forms of rhodopsin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**, 942-947.
- Zidar, D.A., Violin, J.D., Whalen, E.J., Lefkowitz, R.J.** (2009). Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 9649-9654.

## 6 Anhang

### 6.1 Pufferliste

**Tabelle 10:** Liste der in dieser Arbeit eingesetzten Pufferlösungen

Name	Zusammensetzung
A	70 mM Kaliumphosphat, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT 0,5 mM PMSF, pH = 7,0
B	5 mM PIPES, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH = 7,0
C	20 mM BTP, 130 mM NaCl, 1 mM MgCl <sub>2</sub> , pH = 7,5
D	100 mM Kaliumphosphat (14 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> & 7 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ad 1 l), pH = 7,4
E	50 mM HEPES, pH = 7,0
F	50 mM HEPES, 130 mM NaCl, pH = 7,0
G	10 mM Imidazol, 0,05 % DDM, pH = 7,0
H	100 mM HEPES, pH = 8,0
I	10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, pH = 7,0
J	10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, pH = 7,0
K	10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 1 M NaCl, pH = 7,0
Färbelösung	0,2 % SERVA Blau R (Serva # 35051) in 90 % EtOH (100 mg in 50 ml 90 % EtOH)
Entfärber	20 % EtOH, 10 % Essigsäure
TBS-T <sub>0,1</sub> %	10 ml 1 M Tris pH = 8,0; 30 ml 5 M NaCl, 960 ml ddH <sub>2</sub> O, 1 ml Tween <sup>®</sup> 20
5-fach PP	2,5 ml 20-fach Probenpuffer (14,108 g Tris-HCL, pH = 6,8; ad 100 ml ddH <sub>2</sub> O), 2,5 ml Glycerin, 2,5 ml 1 M DTT, 1 g SDS, 1 mg Bromphenolblau, 1 ml 0,5 M EDTA, pH = 6,8; ad 10 ml ddH <sub>2</sub> O

### 6.2 Extinktionskoeffizienten

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurden folgende Extinktionskoeffizienten verwendet:

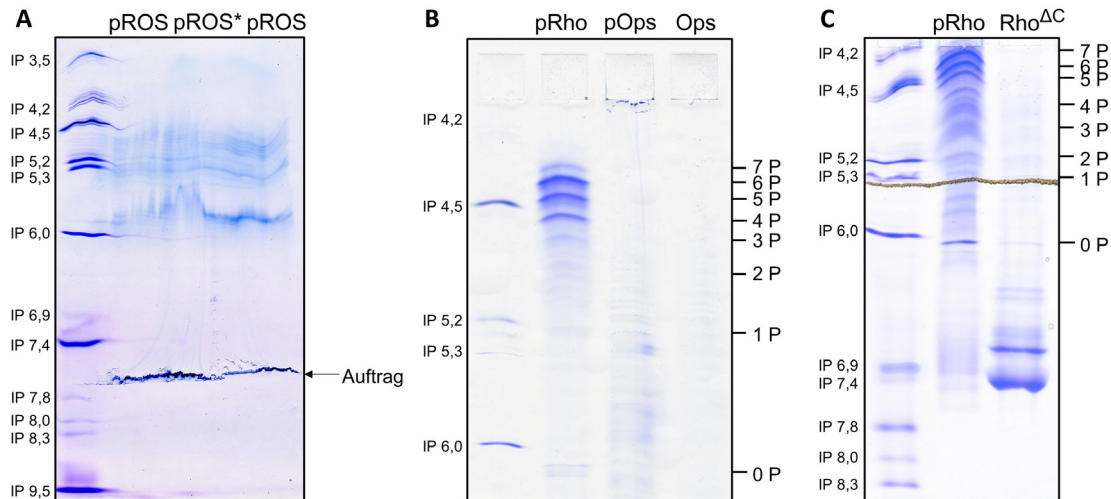
**Tabelle 11:** Liste der verwendeten Extinktionskoeffizienten

Probe	Wellenlänge	Extinktionskoeffizient	Quelle
Rhodopsin	500 nm	$\epsilon = 0,0406 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Wald & Brown, 1953
11- <i>cis</i> -Retinal	380 nm	$\epsilon = 0,0244 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Jäger et al., 1996
Arrestin WT	287 nm	$\epsilon = 0,02636 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Schubert et al., 1999
Arrestin I72NBD	287 nm	$\epsilon = 0,02076 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Sommer et al. 2007
Arrestin S344NBD	287 nm	$\epsilon = 0,02076 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Sommer et al. 2007
Arrestin I299B/L73W	287 nm	$\epsilon = 0,02636 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Sommer et al. 2015
mBBr (Bimane)	390 nm	$\epsilon = 0,005 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Mansoor et al., 1999
IANBD (NBD)	500 nm	$\epsilon = 0,025 \mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$	Sommer et al. 2011



## 6.3 Ergänzende Abbildungen

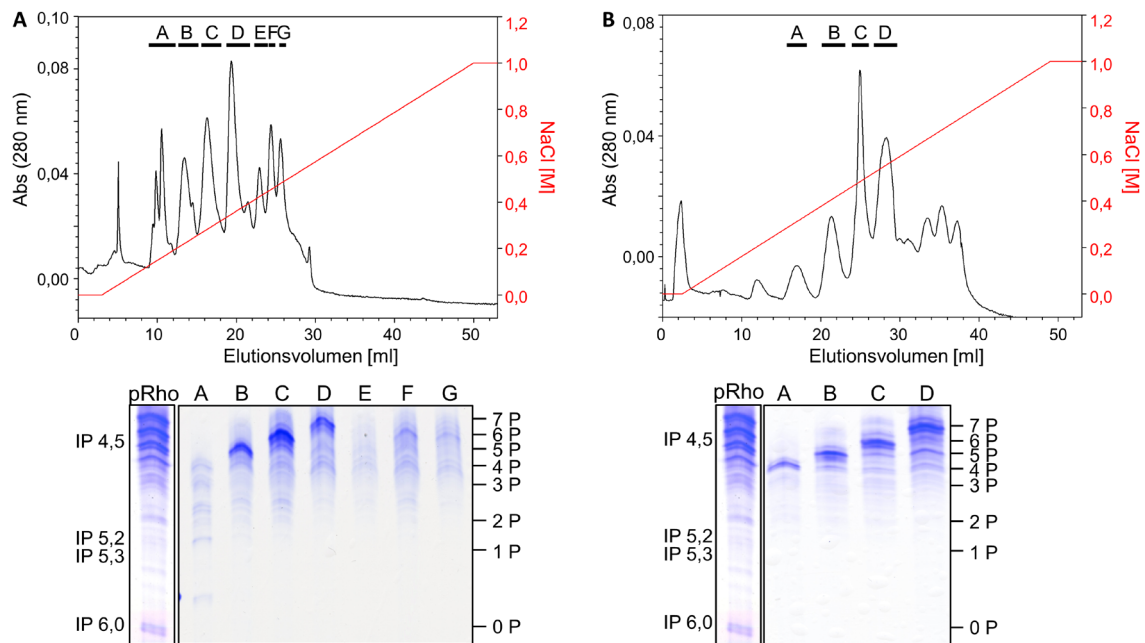
### 6.3.1 IEF-Bedingungen



**Abbildung 45: Einfluss von Phospholipiden, Retinal und Proteolyse durch Asp-N in der IEF**

(A) IEF-Gel mit phosphorylierten Diskmembranen ohne ConA-Aufreinigung im Dunkeln (pROS) bzw. belichtet (pROS\*). Die negativ geladenen Phospholipide der Membranen stören die Trennung der phosphorylierten Rhodopsin-Spezies. (B) IEF-Gel mit über ConA gereinigtem, lipidfreiem pRhodopsin vor (pRho) und nach Belichtung (pOps). Ebenfalls wurde unphosphoryliertes, belichtetes Rhodopsin aufgetragen (Ops). Opsin bzw. pOpsin ist in Detergens nicht stabil und kann daher nicht für die IEF-Analyse verwendet werden. (C) IEF-Vergleich von pRho und C-terminuslosem Rho (Rho<sup>ΔC</sup>) (nach Proteolyse durch Asp-N). Während der IEF kam es durch zu wenig Kühllösung zu einer lokalen Brandstelle auf dem IEF-Gel (hellbrauner Strich), die das Trennergebnis aber nicht beeinflusste.

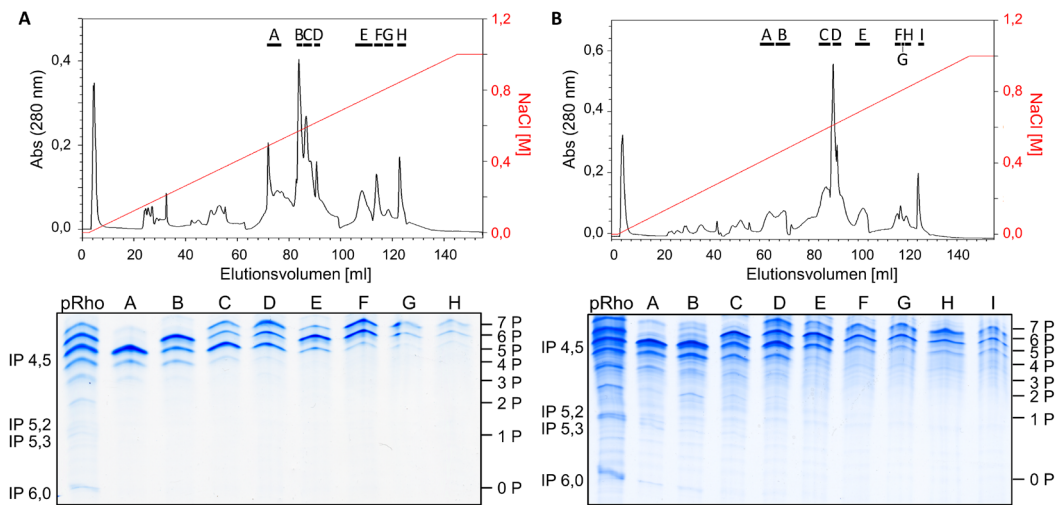
### 6.3.2 RS-Vergleich mit unterschiedlichem pH-Wert



**Abbildung 46: RS-Vergleich mit unterschiedlichem pH-Wert**

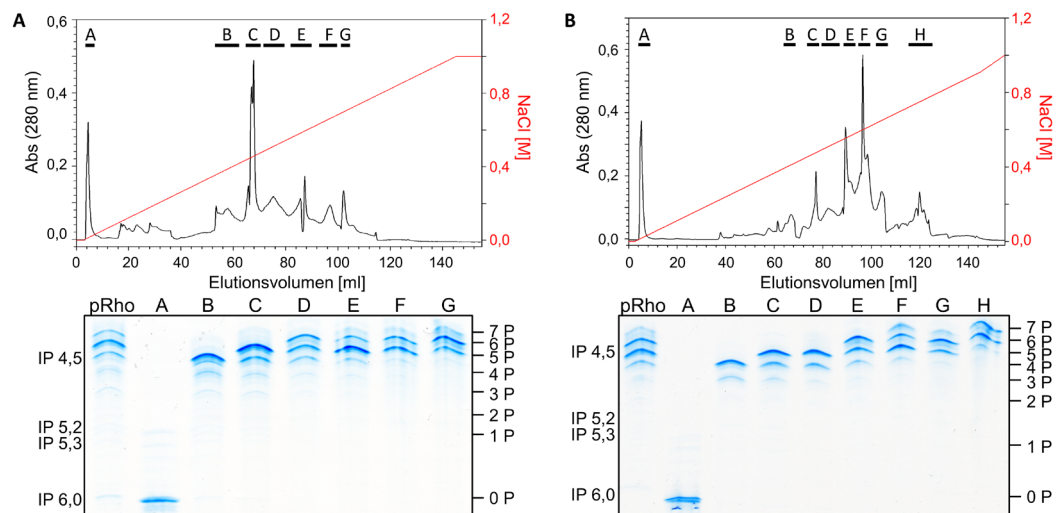
(A, oben) RS-Elutionsprofil (Laufpuffer bei pH = 8) einer hochphosphorylierten Rhodopsin-Präparation (~ 1 mg) mit vereinigten Fraktionen (A bis G), die nach Aufbereitung via IEF aufgetrennt wurden (unten). (B, oben) RS-Elutionsprofil (Laufpuffer bei pH = 6) einer hochphosphorylierten Rhodopsin-Präparation mit vereinigten Fraktionen (A bis D), die via IEF aufgetrennt wurden (unten). Die Anzahl der Phosphate wurde rechts den Banden anhand der IPs zugeordnet (0 P bis 7 P).

### 6.3.3 Weitere RS-Läufe



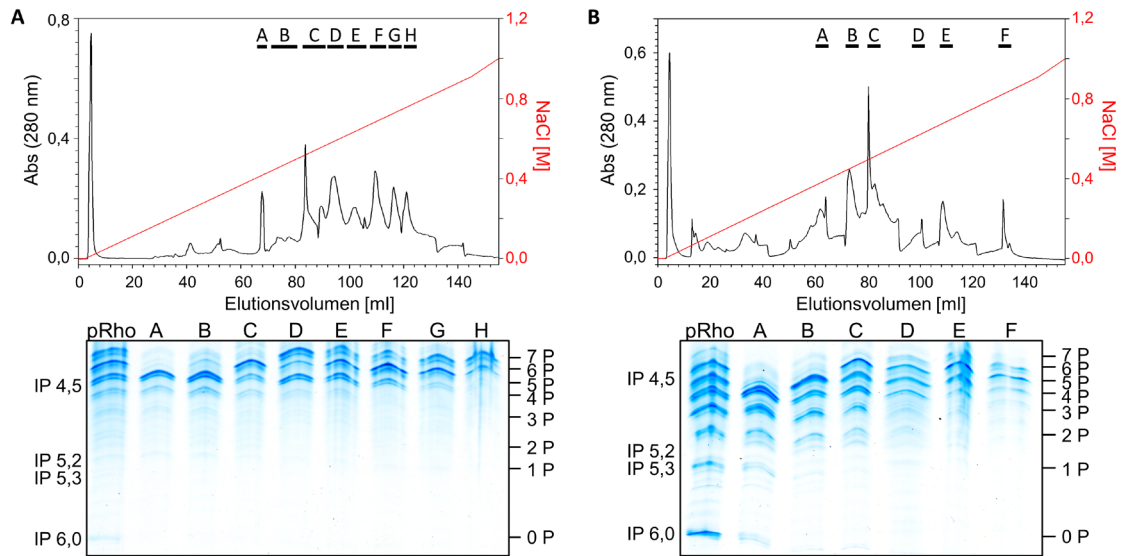
**Abbildung 47: RS-Lauf #20 & #21**

RS-Elutionsprofil #20 (A, oben) sowie #21 (B, oben) einer hochphosphorylierten Rhodopsin-Präparation mit vereinigten Fraktionen (A bis H bzw. A bis I), die nach Aufbereitung via IEF aufgetrennt wurden (unten). Die Anzahl der Phosphate wurde rechts den Banden aufgrund der IPs zugeordnet (0 P bis 7 P). In diesen Läufen wurden 10 mg (A) bzw. 14 mg (B) pRho aufgetrennt, um mit den pRho-Spezies weiterzuarbeiten.



**Abbildung 48: RS-Lauf #23 & #24**

RS-Elutionsprofil #23 (A, oben) sowie #24 (B, oben) einer hochphosphorylierten Rhodopsinpräparation mit vereinigten Fraktionen (A bis G bzw. A bis H), die nach Aufbereitung via IEF aufgetrennt wurden (unten). Die Anzahl der Phosphate wurde rechts den Banden aufgrund der IPs zugeordnet (0 P bis 7 P). In diesen Läufen wurden je 12 mg pRho aufgetrennt, um mit den pRho-Spezies weiterzuarbeiten.



**Abbildung 49: RS-Lauf #25 & #26**

RS-Elutionsprofil #25 (A, oben) sowie #26 (B, oben) einer hochphosphorylierten Rhodopsin-Präparation mit vereinigten Fraktionen (A bis H bzw. A bis F), die nach Aufbereitung via IEF aufgetrennt wurden (unten). Die Anzahl der Phosphate wurde rechts den Banden aufgrund der IPs zugeordnet (0 P bis 7 P). In diesen Läufen wurden je 12 mg pRho aufgetrennt, um mit den pRho-Spezies weiterzuarbeiten.

### 6.3.4 RS-Läufe im Überblick

Die Auswertung der einzelnen RS-Läufe werden nachfolgend tabellarisch zusammengefasst (siehe Tabelle 12 bis Tabelle 15 ab Seite 151). Die einzelnen Fraktionen (A bis L) wurden dabei den jeweiligen pRho-Spezies zugeordnet. Die unterstrichene, fettgedruckte Zahl zeigt die vorherrschende Anzahl an Phosphorylierung an, welche die am intensivsten gefärbte Bande im IEF-Gel zeigt. Zur Überprüfung der Reinheit der Fraktionen wurde das  $\text{Abs}_{280} / \text{Abs}_{500}$ -Verhältnis angegeben. Ebenso zeigt die Tabelle die eluierten Massen, die ursprüngliche Einsatzmenge und die Herkunft von pRho (deutsche oder amerikanische Retinae). Die Abkürzungen pR18, pR21, pR24, pR26 sowie pR27 bezeichnen den pRho-Präparationsstock, welcher das Ausgangsmaterial für die RS-Läufe bildete.

Tabelle 12: RS-Lauf #17 &amp; #19

<b>RS-Lauf #17</b>				<b>RS-Lauf #19</b>			
Stock: pR18 (hochP) (dt.) <sup>1</sup>				Stock: pR21 (hochP) (dt.) <sup>1</sup>			
Einsatz: 7 mg				Einsatz: 8,4 mg			
Fraktion	P*	Ratio**	Masse	Fraktion	P*	Ratio**	Masse
A	-	-	-	A	<u>5</u> ,4,3-P	1,69	1,3 mg
B	<u>2</u> ,1-P	1,95	90 µg	B	<u>6</u> ,5,4-P	1,71	0,97 mg
C	<u>3</u> ,2,1-P	2,7	44 µg	C	7,6, <u>5</u> ,4-P	1,72	1 mg
D	<u>4</u> ,3,2,1-P	1,87	108 µg	D	<u>7</u> , <u>6</u> , <u>5</u> -P	1,77	0,59 mg
E	<u>5</u> ,4,3-P	1,76	223 µg	E	7, <u>6</u> ,5-P	1,8	0,68 mg
F	<u>5</u> ,4,3-P	1,76	175 µg	F	<u>7</u> , <u>6</u> -P	2,0	0,41 mg
G	<u>6</u> ,5,4-P	1,6	1,8 mg	G	<u>7</u> ,6-P	2,27	0,14 mg
H	7,6, <u>5</u> ,4-P	1,66	1 mg	H	<u>7</u> ,6-P	3,88	88 µg
I	<u>7</u> , <u>6</u> , <u>5</u> -P	1,68	875 µg	* Phosphorylierungsniveau			
J	7, <u>6</u> ,5-P	1,7	743 µg	**Abs <sub>280</sub> / Abs <sub>500</sub> -Verhältnis zur Reinheitsbestimmung			
K	<u>7</u> , <u>6</u> -P	1,75	686 µg	<sup>1</sup> deutsche Retinae			
L	<u>7</u> ,6-P	2,0	154 µg				

Tabelle 13: RS-Lauf #20 &amp; #21

<b>RS-Lauf #20</b>				<b>RS-Lauf #21</b>			
Stock: pR21 (hochP) (dt.) <sup>1</sup>				Stock: pR21 (hochP) (dt.) <sup>1</sup>			
Einsatz: 8,4 mg				Einsatz: 14 mg			
Fraktion	P*	Ratio**	Masse	Fraktion	P*	Ratio**	Masse
A	<u>5</u> ,4,3-P	1,69	714 µg	A	<u>5</u> ,4,3-P	1,71	361 µg
B	<u>6</u> ,5,4-P	1,77	1 mg	B	<u>5</u> ,4,3-P	1,69	492 µg
C	7,6, <u>5</u> ,4-P	1,78	0,9 mg	C	<u>6</u> ,5,4-P	1,69	0,55 mg
D	<u>7</u> , <u>6</u> , <u>5</u> -P	1,89	0,25 mg	D	7,6, <u>5</u> ,4-P	1,7	2,2 mg
E	7, <u>6</u> ,5-P	2,0	0,47 mg	E	<u>7</u> , <u>6</u> , <u>5</u> -P	1,9	0,49 mg
F	<u>7</u> , <u>6</u> -P	2,2	0,26 mg	F	7, <u>6</u> ,5-P	2,2	0,14 mg
G	<u>7</u> ,6-P	2,6	0,1 mg	G	<u>7</u> , <u>6</u> -P	1,5	0,26 mg
H	<u>7</u> ,6-P	4,3	98 µg	H	<u>7</u> ,6-P	2,35	122 µg
* Phosphorylierungsniveau				I	<u>7</u> ,6-P	2,9	128 µg

\*\*Abs<sub>280</sub> / Abs<sub>500</sub> -Verhältnis zur Reinheitsbestimmung<sup>1</sup> deutsche Retinae

Tabelle 14: RS-Lauf #23 &amp; #24

<b>RS-Lauf #23</b>				<b>RS-Lauf #24</b>			
Stock: pR24 (hochP) (dt.) <sup>1</sup>				Stock: pR21 (hochP) (dt.) <sup>1</sup>			
Einsatz: 12 mg				Einsatz: 12 mg			
Fraktion	P*	Ratio**	Masse	Fraktion	P*	Ratio**	Masse
A	0 P	-	-	A	0 P	3	135 µg
B	<u>4</u> ,3-P	1,8	172 µg	B	<u>4</u> ,3-P	1,8	117 µg
C	<u>5</u> ,4,3-P	1,7	568 µg	C	<u>5</u> ,4,3-P	1,7	186 µg
D	<u>6</u> ,5,4-P	1,76	1,4 mg	D	<u>6</u> ,5,4-P	1,7	307 µg
E	7,6, <u>5</u> ,4-P	1,84	1,2 mg	E	7,6, <u>5</u> ,4-P	1,7	524 µg
F	7,6, <u>5</u> ,4-P	2,0	0,8 mg	F	7,6, <u>5</u> ,4-P	1,7	686 µg
G	7, <u>6</u> ,5-P	2,15	373 µg	G	7, <u>6</u> ,5-P	2,0	232 µg
H	<u>7</u> ,6-P	3,5	41 µg	H	<u>7</u> ,6-P	2,4	632 µg

\* Phosphorylierungsniveau

\*\*Abs<sub>280</sub>/Abs<sub>500</sub>-Verhältnis zur Reinheitsbestimmung<sup>1</sup>deutsche Retinae

Tabelle 15: RS-Lauf #25 &amp; #26

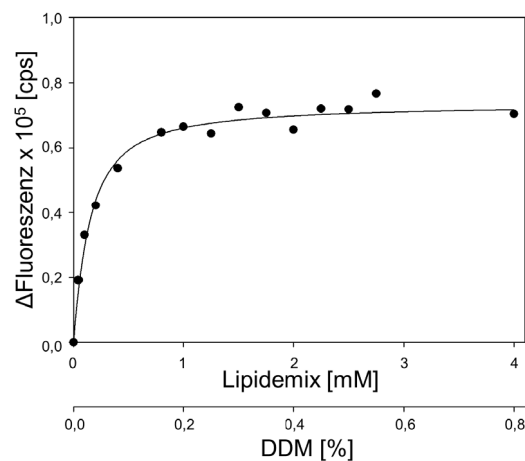
<b>RS-Lauf #25</b>				<b>RS-Lauf #26</b>			
Stock: pR26 (hochP) (dt.) <sup>1</sup>				Stock: pR27 (hochP) (amer.) <sup>2</sup>			
Einsatz: 14,4 mg				Einsatz: 12 mg			
Fraktion	P*	Ratio**	Masse	Fraktion	P*	Ratio**	Masse
A	<u>5</u> ,4,3-P	1,72	351 µg	A	<u>4</u> ,3,2,1-P	1,83	1 mg
B	<u>5</u> ,4,3-P	1,73	635 µg	B	<u>5</u> ,4,3,2-P	1,88	1,3 mg
C	<u>6</u> ,5,4-P	1,68	1,8 mg	C	<u>6</u> ,5,4-P	1,83	1,6 mg
D	<u>7</u> ,6, <u>5</u> ,4-P	1,69	1,8 mg	D	7, <u>6</u> , <u>5</u> ,4-P	2,18	407 µg
E	<u>7</u> ,6, <u>5</u> -P	1,74	1,2 mg	E	<u>7</u> ,6, <u>5</u> -P	2,19	847 µg
F	7, <u>6</u> ,5-P	1,74	1,46 mg	F	7, <u>6</u> ,5-P	3,43	181 µg
G	<u>7</u> ,6-P	1,8	930 µg				
H	<u>7</u> ,6-P	2,0	943 µg				

\* Phosphorylierungsniveau

\*\*Abs<sub>280</sub>/Abs<sub>500</sub>-Verhältnis zur Reinheitsbestimmung<sup>1</sup>deutsche Retinae<sup>2</sup>amerikanische Retinae

### 6.3.5 Lipidemix-Bedingungen

Der 0 mM bis 4 mM Lipidemix in 0 % bis 1 % DDM (40 % PC, 40 % PE, 20 % PS) wurde mit 2  $\mu$ M gereinigtem Rhodopsin (hochP) und 1  $\mu$ M Arr I72B in Puffer F titriert (siehe Abbildung 50). Die ermittelte Einsatzkonzentration von 1,5 mM Lipidemix in 0,3 % DDM wurde für weitere Titrationsen genutzt (siehe 2.4.2.3 ab Seite 52).

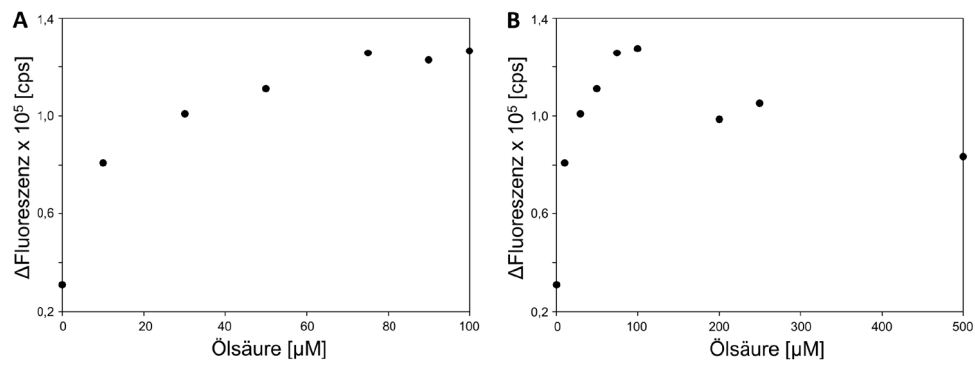


**Abbildung 50: Lipidemix-Titration**

2  $\mu$ M gereinigtes pRho wurde mit 1  $\mu$ M Arr I72B in Puffer F versetzt und mit 0 mM bis 4 mM Lipidemix/ 0 % bis 1 % DDM (40 % PC, 40 % PE, 20 % PS) titriert, um die optimalen Bindungsbedingungen zu bestimmen. Je Konzentration wurde die Fluoreszenz im Dunkeln und nach voller Photoaktivierung des Rezeptors gemessen und die Fläche unter der Kurve integriert.  $\Delta$ Fluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten, integrierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Spektrums.

### 6.3.6 Ölsäure-Bedingungen

0  $\mu$ M bis 500  $\mu$ M Ölsäure wurden mit 2  $\mu$ M gereinigtem pRho und 1  $\mu$ M Arr I72B in Puffer F titriert (siehe Abbildung 51). Die ermittelte Einsatzkonzentration von 0,1 mM Ölsäure in 0,1 % DDM wurde für weitere Titrationsen genutzt (siehe 2.4.2.4 ab Seite 53).

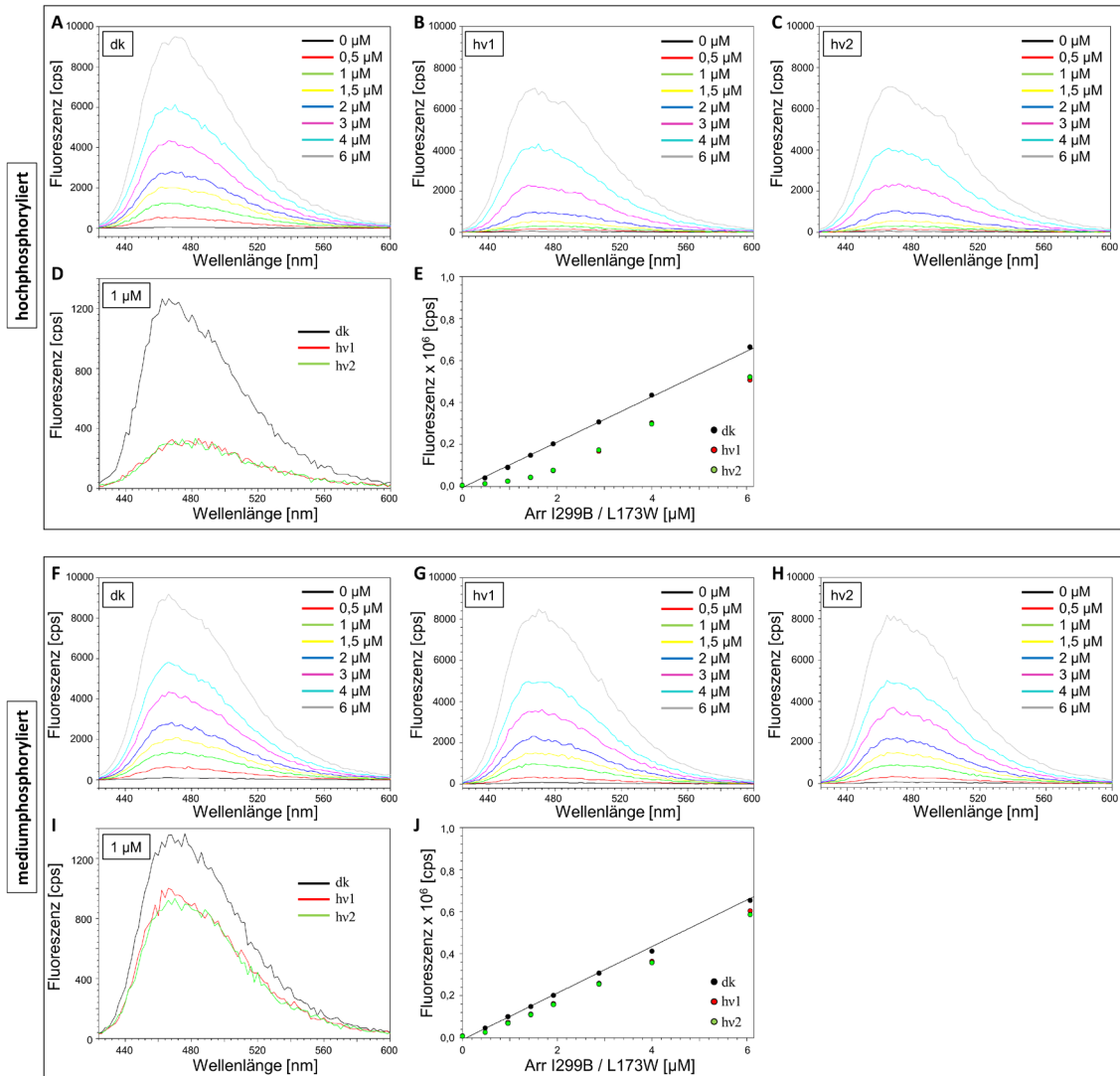


**Abbildung 51: Ölsäure-Titrationsen**

2  $\mu\text{M}$  gereinigtes pRho (hochP) wurde mit 1  $\mu\text{M}$  Arr I72B in Puffer F versetzt und mit 0  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$  Ölsäure titriert, um die optimalen Bindungsbedingungen zu bestimmen (A, B). Je Konzentration wurde die Fluoreszenz im Dunkeln und nach voller Photoaktivierung des Rezeptors gemessen und die Fläche unter der Kurve integriert.  $\Delta\text{Fluoreszenz}$  entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten, integrierten Intensitäten des Dunkel- und Licht-Spektrums.



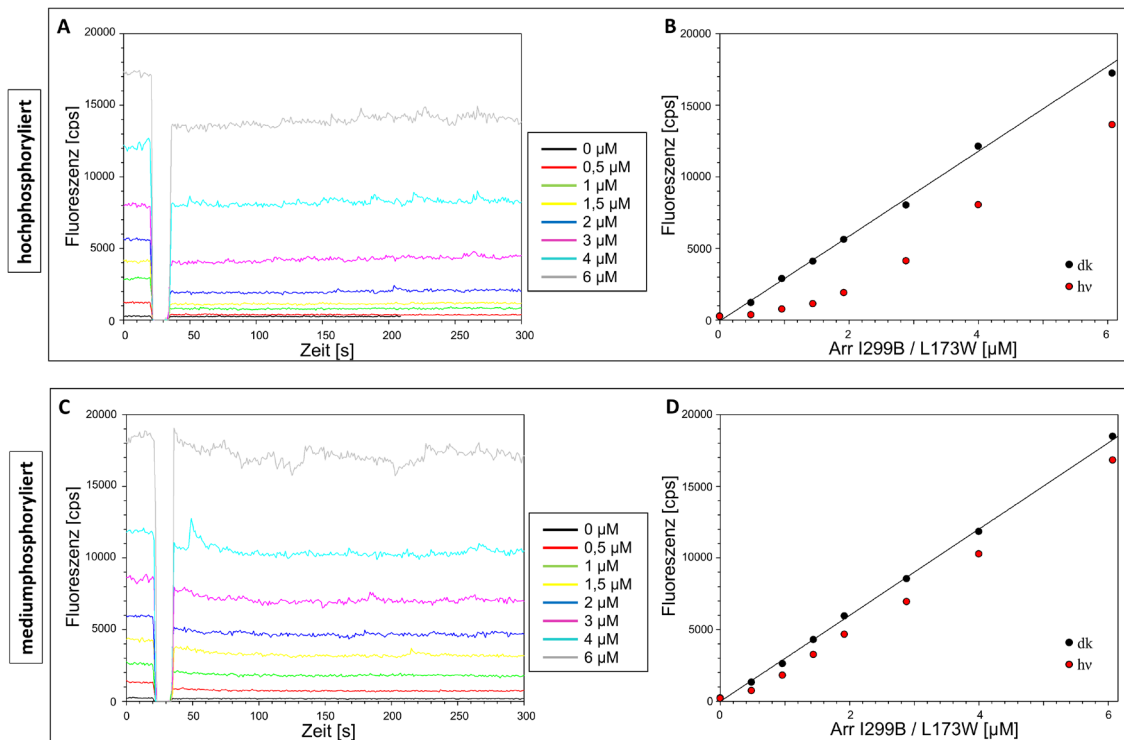
### 6.3.7 Darstellung der stationären Fluoreszenzmessung



**Abbildung 52: Stationäre Fluoreszenzmessung**

Die Bindung von Arr I299B/L173W an gereinigtes pRho wurde über einen Fluoreszenzabfall gemessen. Arr I299B/L173W wurde in Puffer F mit 0,5 mM DOPA/ 0,1 % DDM gegen 2 μM pRho (hochP in A bis E bzw. mediumP in F bis J) titriert (Anregung: 396 nm, Emission: 424 nm bis 600 nm). Die Fluoreszenz wurde im Dunkeln (A, F) und 1 min (B, G), bzw. 2 min (C, H) nach voller Photoaktivierung des Rezeptors gemessen, die Fläche unter der Kurve integriert und gegen die eingesetzte Arrestinkonzentration aufgetragen (E, J). (I, D) zeigen exemplarisch die Graphen (dk: schwarz; hv 1 min: rot; hv 2 min: grün) für den Einsatz von 1 μM Arr I299B/L173W. Die zugehörige  $\Delta$ Fluoreszenz sowie Bindungskurven,  $K_D$  und Bindungsstöchiometrien sind in Abbildung 27 auf Seite 56 dargestellt.

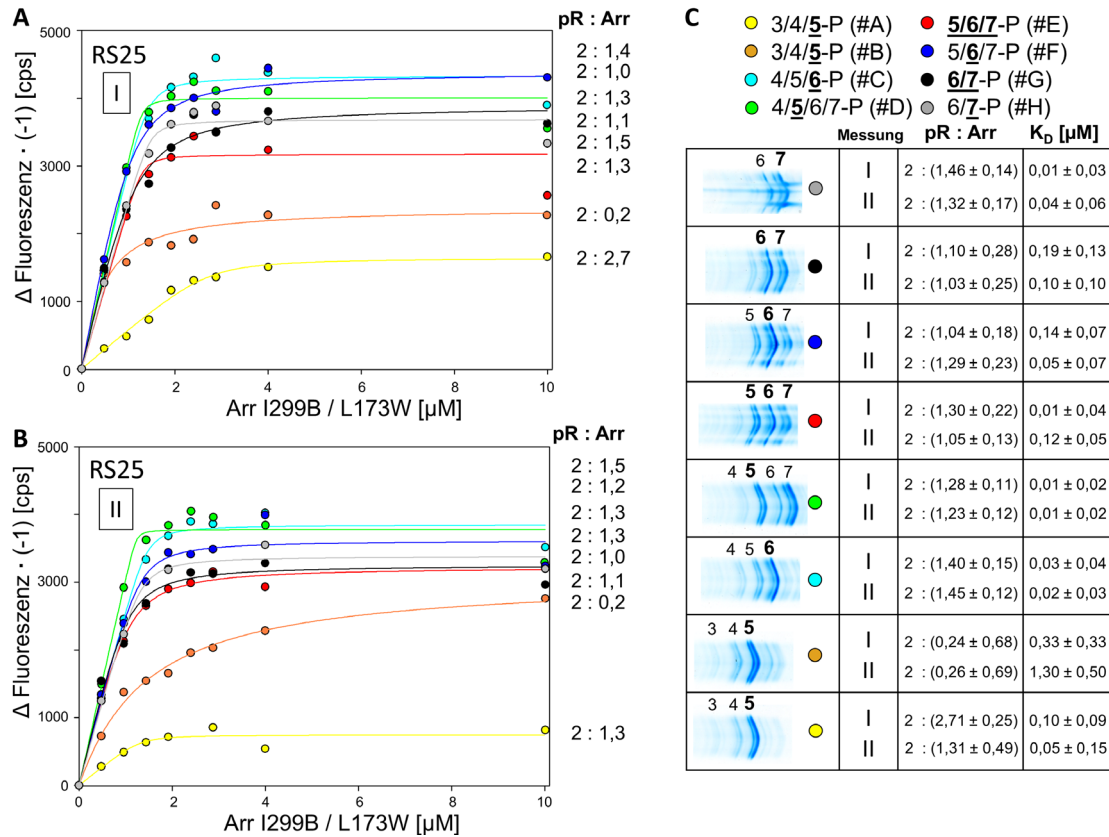
### 6.3.8 Darstellung der zeitbasierten Fluoreszenzmessung



**Abbildung 53: Zeitbasierte Fluoreszenzmessung**

Die Bindung von Arr I299B/L173W an gereinigtes pRho wurde über einen Fluoreszenzabfall gemessen. Arr I299B/L173W wurde in Puffer F mit 0,5 mM DOPA/ 0,1 % DDM gegen 2 µM pRho (hochP: A, B bzw. mediumP: C, D) titriert (Anregung: 396 nm, Emission: 467 nm). Die Fluoreszenzmessung wurde im Dunkeln gestartet (0 s bis 20 s), dann wurde der Rezeptor für 10 s photoaktiviert und anschließend der Fluoreszenzabfall gemessen, bis ein konstantes Signal erreicht wurde (A, C), und gegen die eingesetzte Arrestinkonzentration aufgetragen (B, D, schwarz: dk, rot: belichtet (hv)). Zugehörige  $\Delta$ Fluoreszenz sowie Bindungskurven,  $K_D$  und Bindungsstöchiometrien sind in Abbildung 27 auf Seite 56 dargestellt.

### 6.3.9 Arr I299B/L173W-Titrationsen mit pRho-Spezies aus RS25



**Abbildung 54: Arr I299B/L173W-Titration mit pRho-Spezies aus RS25**

(A-C) Die Bindung von Arr I299B/L173W an pRho-Spezies (RS25 Messung 1 (A) & Messung 2 (B)) wurde über einen zeitbasierten Fluoreszenzanstieg gemessen. 0 μM bis 10 μM Arr I299B/L173W wurden gegen 2 μM pRho-Spezies (siehe verschiedene Farben für Phosphorylierungsniveaus sowie IEF-Gelausschnitte rechts neben den Bindungskurven (C)) titriert. Die Hauptphosphorylierung wurde unterstrichen/fett dargestellt. ΔFluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsabtrahierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Signals. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität (K<sub>D</sub>) und die Bindungsstöchiometrie (nach Reihenfolge der Linien sortiert); die zugehörigen Werte sind in den Boxen angegeben (C). Puffer- und Messbedingungen: siehe Bildunterschrift von Abbildung 31 auf Seite 65.

## 6.3.10 Arr S344NBD-Titrationsen mit pRho-Spezies aus RS25

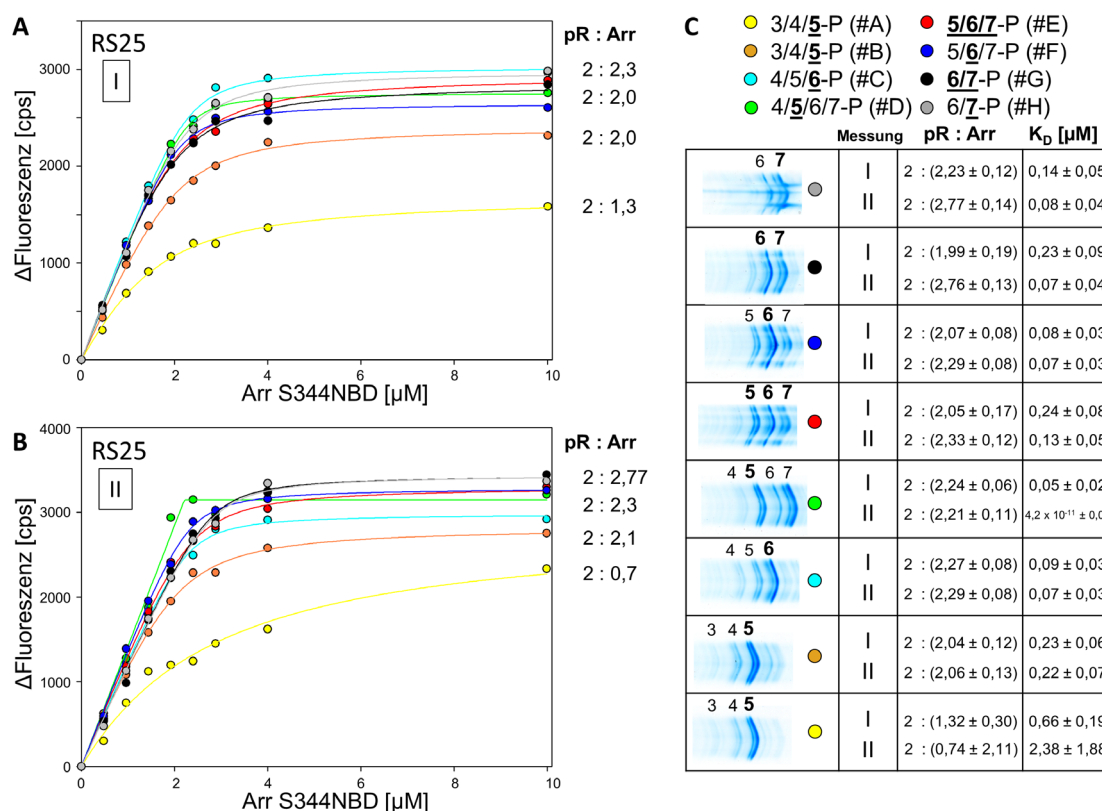
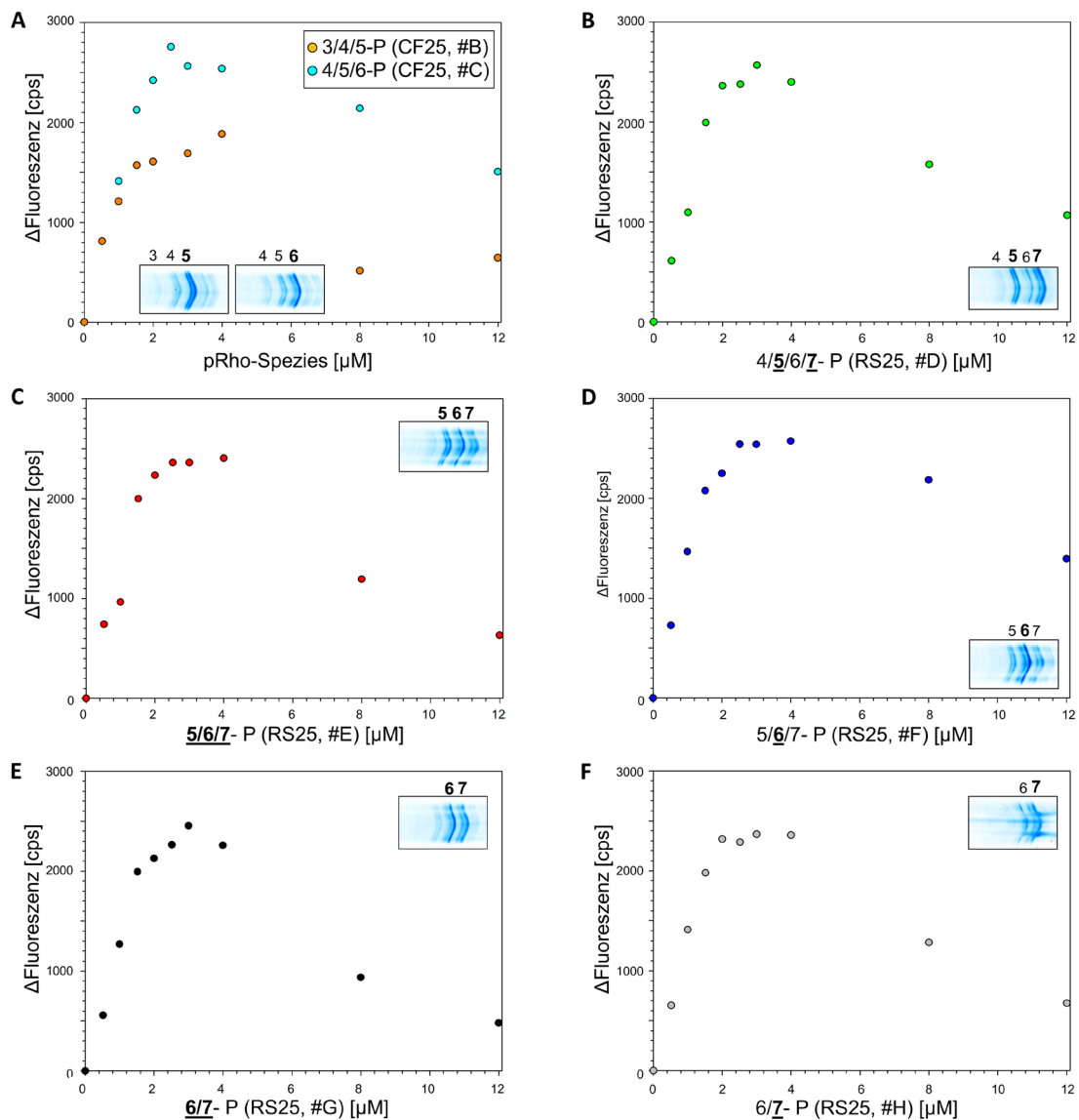


Abbildung 55: Arr S344NBD-Titration mit pRho-Spezies aus RS25

(A-C) Die Bindung von Arr S344NBD an pRho-Spezies (RS25 Messung 1 (A) & Messung 2 (B)) wurde über einen zeitbasierten Fluoreszenzanstieg gemessen. 0 μM bis 10 μM Arr S344NBD wurden gegen 2 μM pRho-Spezies (siehe verschiedene Farben für Phosphorylierungsniveaus sowie IEF-Gelausschnitte rechts neben den Bindungskurven (C)) titriert. Die Hauptphosphorylierung wurde unterstrichen/fett dargestellt. ΔFluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsubtrahierten Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Signals. Die Anpassung der Datenpunkte an eine Bindungskurve (Linien) ergibt die Affinität ( $K_D$ ) und die Bindungsstöchiometrie (nach Reihenfolge der Linien sortiert); die zugehörigen Werte sind in den Boxen angegeben (C). Puffer- und Messbedingungen: siehe Bildunterschrift von Abbildung 30 auf Seite 62.

### 6.3.11 Weitere Rezeptortitrationen mit Arr S344NBD



**Abbildung 56: Weitere Rezeptortitrationen**

Die Bindung von Arr S344NBD an pRho-Spezies (aus RS25, 3/4/5-P #B<sub>RS25</sub> & 4/5/6-P #C<sub>RS25</sub> (A); 4/5/6/7-P #D<sub>RS25</sub> (B); 5/6/7-P #E<sub>RS25</sub> (C); 5/6/7-P #F<sub>RS25</sub> (D); 6/7-P #G<sub>RS25</sub> (E); 6/7-P #H<sub>RS25</sub> (F)) wurde über einen zeitbasierten Fluoreszenzanstieg gemessen. 0  $\mu$ M bis 12  $\mu$ M der jeweiligen pRho-Spezies (A bis F) gegen 2  $\mu$ M Arr S344NBD titriert. Die Hauptphosphorylierung wurde unterstrichen/fett dargestellt. IEF-Ausschnitte sind in Boxen dargestellt.  $\Delta$ Fluoreszenz entspricht der Differenz zwischen den hintergrundsabgezogenen Fluoreszenzintensitäten des Dunkel- und Licht-Signals. Puffer- und Messbedingungen: siehe Bildunterschrift von Abbildung 30 auf Seite 62.



## **7 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Vivien Vogt, geboren am 03.03.1989 in Berlin, Matrikel-Nr. 580105 der Humboldt-Universität zu Berlin, die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfen und Hilfsmittel angefertigt zu haben. Ich habe mich anderwärts nicht um einen Doktorgrad beworben und besitze keinen entsprechenden Doktorgrad. Ich erkläre, dass ich die Dissertation oder Teile davon nicht bereits bei einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung eingereicht habe und dass sie dort weder angenommen noch abgelehnt wurde. Ich erkläre die Kenntnisnahme der dem Verfahren zugrunde liegenden Promotionsordnung der Lebenswissenschaftlichen Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin vom 5. März 2015. Weiterhin erkläre ich, dass keine Zusammenarbeit mit gewerblichen Promotionsbearbeiterinnen/Promotionsberatern stattgefunden hat und dass die Grundsätze der Humboldt-Universität zu Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten wurden.

Berlin, den 26. Oktober 2020

---

Vivien Vogt